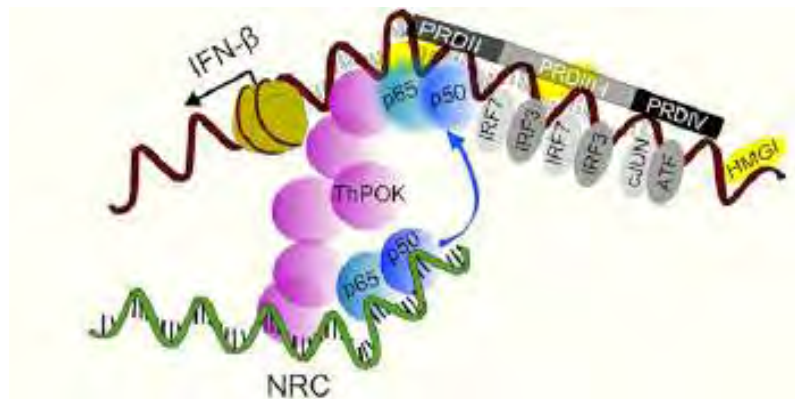


Διπλωματική εργασία

«Μελέτη του ρόλου της πρωτεΐνης ThPOK στην ανθρώπινη
αντική μεταγραφική απόκριση»



ΘΕΟΔΟΣΙΟΥ ΒΑΙΟΣ

Επιβλέπων καθηγητής: Θάνος Δημήτριος

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, IIBΕΑΑ
Αθήνα, 2017-2018

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
Δομή χρωματίνης	4
Ιστόνες	6
Μεταγραφικοί παράγοντες	7
Μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ	8
Οι μεταγραφικοί παράγοντες IRFs	10
Ο μεταγραφικός παράγοντας ThPOK	11
Ιντερφερόνες (IFNs)	12
Ενισχυόσωμα της IFN-β	13
Διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις της IFN- β μετά από ιική μόλυνση	15
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ	18
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	22
Κυτταροκαλλιέργειες	22
Απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων	24
Ανοσοαποτύπωση κατά western	25
Απομόνωση RNA	29
PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR)	30
PCR πραγματικού χρόνου (REAL TIME-PCR)	31
Συνεργατική ανοσοκατακρήμνιση (Co-IP)	32
Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP)	34
Διασύνδεση πρωτεϊνών (Crosslinking)	34
Προετοιμασία της χρωματίνης για κατάτμηση	35
Κατάτμηση της χρωματίνης με τη βοήθεια υπερήχων (sonication)	36
Έλεγχος κατάτμησης DNA	36
Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης	37
Πρόσδεση αντισώματος σε μαγνητικά σφαιρίδια	38
Καθαρισμός χρωματίνης με μαγνητικά σφαιρίδια	38
Ανοσοκατακρήμνιση	39
Πλύσεις	39
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	42
Καταστολή έκφρασης γονιδίου ZBTB7B	42
Ανοσοαποτύπωμα κατά Western	42
Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου της IFN-β	43

Συν-ανοσοκατακρήμνιση (Co-IP).....	45
Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP).....	46
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	50
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	52

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Θάνος Δημήτριος, Ερευνητής Α΄, Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ)

Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος, Καθηγητής μοριακής βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Ψαρρά Άννα-Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων καθηγητή μου κ. Δημήτρη Θάνο που μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο του και να συνεργαστώ με εξαιρετικά άτομα μέσα σε αυτό. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Χρύσα Νικοπούλου, καθώς και τον υποψήφιο διδάκτορα του εργαστηρίου και φίλο **Γιώργο Παναγόπουλο**, ο οποίος αποτέλεσε τον βασικό πυλώνα της όποιας εξέλιξης είχα στο εργαστήριο σε θεωρητικό αλλά και τεχνικό επίπεδο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων ιντερφερόνης τύπου I πυροδοτεί την ανθρώπινη αντιική απόκριση. Πιο συγκεκριμένα η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της ανθρώπινης IFN-β απαιτεί ένα στοιχείο ενισχυτή άνωθεν του υποκινητή, το οποίο αναγνωρίζεται από τρεις διακριτές ομάδες μεταγραφικών παραγόντων (NF-κB, IRFs και ATF-2/cJun) και από την αρχιτεκτονική πρωτεΐνη HMGI(Y). Διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ τριών γενωμικών περιοχών (NRCs) που εδράζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα και του γονιδίου της IFN-β, λαμβάνουν χώρα μετά από ιική μόλυνση, στο 20% των κυττάρων περίπου. Για την αλληλεπίδρασή των NRCs με τον ενισχυτή της IFN-β είναι απαραίτητη τόσο η θέση πρόσδεσης του NF-κB όσο και οι παρακείμενες GAGA αλληλουχίες στις οποίες προσδένεται η πρωτεΐνη ThPOK. Σε αυτή την εργασία μελετάμε τον ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα ThPOK στην αντιική απόκριση μέσω της μεταγραφικής ενεργοποίησης της IFN-β, με την πραγματοποίηση *in vivo* πειραμάτων.

ABSTRACT

The transcriptional activation of type I interferons genes initiates the human antiviral response. In particular, transcriptional activation of the human IFN-β gene requires an enhancer element upstream of the promoter, which is recognized by three distinct transcription factors (NF-κB, IRFs και ATF-2/cJun) and by the architecture protein HMGI(Y). Interchromosomal interactions between three genomic regions (NRCs) based on different chromosomes and the IFN-β gene, occur after viral infection in about 20% of the cells. For the interaction of NRCs with the IFN-β enhancer, both the binding site of NF-κB and the adjacent GAGA sequences to which the ThPOK protein binds is necessary. In this paper we study the role of the ThPOK transcription factor in the antiviral response by transcriptional activation of IFN-β, by performing *in vivo* experiments.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Δομή χρωματίνης

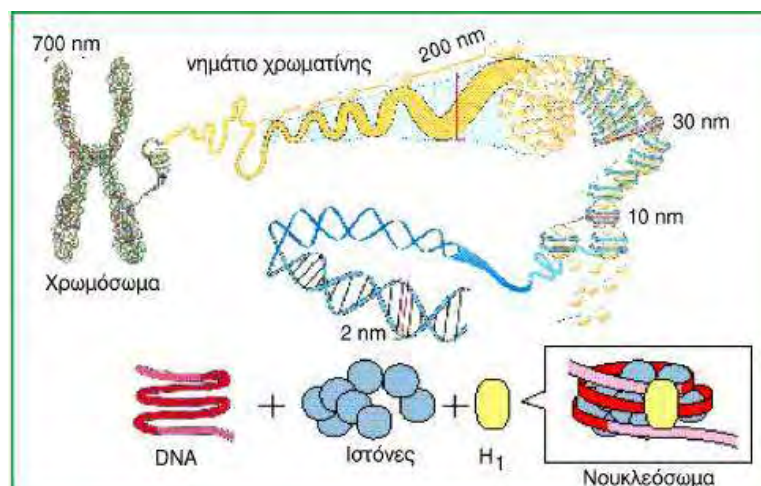
Τα μόρια DNA ενός κυττάρου αποτελούν το γονιδιώμά του. Η αποκωδικοποίηση και η χρήση της πληροφορίας που είναι αποθηκευμένη στο γονιδίωμα από τους κυτταρικούς μηχανισμούς αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία που έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη όλων των οργανισμών, από τον πιο απλό (μονοκύτταρα βακτήρια) έως τον πιο σύνθετο (άνθρωπος). Οι πρωτεΐνες είναι αυτές που καθορίζουν τις βιοχημικές ιδιότητες του κυττάρου και τελικά καθορίζουν τις χαρακτηριστικές ιδιότητες κάθε έμβιου είδους.

Αν ξεδιπλώναμε σε ευθεία γραμμή όλα τα χρωμοσώματα ενός ανθρώπινου κυττάρου, το συνολικό τους μήκος θα έφτανε τα 2 μέτρα, και όλο αυτό συμπυκνώνεται μέσα στον κυτταρικό πυρήνα διαμέτρου 10μm. Τα χρωμοσώματα αποτελούν τις μεγαλύτερες και περισσότερο ορατές δομές που εμπλέκονται στη μεταφορά της γενετικής πληροφορίας. Η διαδικασία της χωροταξικής αποκατάστασης του γενετικού υλικού στηρίζεται σε ένα μηχανισμό βαθμιαίας συμπύκνωσης του με τη βοήθεια ποικίλων πρωτεϊνών. Με λίγα λόγια μέσα στον ευκαρυωτικό πυρήνα, το γονιδιωματικό DNA συνυπάρχει με έναν αρκετά μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών, έτσι κανείς πλέον δεν μπορεί να μιλήσει για DNA, αλλά για χρωματίνη, το σύμπλοκο δηλαδή που συστήνει το DNA με τις πρωτεΐνες αυτές. Μεταξύ των χρωματινικών πρωτεϊνών, αυτές με την μεγαλύτερη αφθονία είναι οι ιστόνες. Οι άλλες πρωτεΐνες, οι λεγόμενες μη-ιστόνες είναι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην αναδίπλωση της χρωματίνης, ενώ οι ιστόνες που είναι πλούσιες σε βασικά αμινοξέα, συμμετέχουν στη συγκρότηση του νουκλεοσώματος. Κάθε μόριο νουκλεοσώματος αποτελείται από 8 μόρια πρωτεϊνών(ιστόνες) γύρω από το οποία τυλίγεται DNA μήκους 146 ζευγών βάσεων. Η οργάνωση του DNA σε νουκλεοσώματα αν και τυπικά αποτελεί περίπτωση πρόσδεσης DNA σε πρωτεΐνη, διαφέρει ως προς τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- 1) Το DNA δεν προσδένεται σε μια πρωτεΐνη αλλά ουσιαστικά εγκολπώνει ένα ολόκληρο πρωτεϊνικό σύμπλοκο.
- 2) Το μήκος του DNA που αλληλοεπιδρά με την πρωτεΐνη ξεπερνά κατά μια τάξη μεγέθους ακόμα και τα μεγαλύτερα σε έκταση μοτίβα πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων.
- 3) Περίπου το 85-90% του γονιδιωματικού DNA είναι συνδεδεμένο σε νουκλεοσώματα. Η πρόσδεση του DNA με τις ιστόνες είναι έτσι πολύ συχνότερη ακόμη και σε σχέση με τους πιο άφθονους μεταγραφικούς παράγοντες.

Τα $3,2 \cdot 10^9$ νουκλεοτίδια του γονιδιώματος του ανθρώπου χωρίζονται σε 24 διαφορετικά χρωμοσώματα. Στα χρωμοσώματα του ανθρώπου περίπου 25.000 γονίδια οργανώνονται ανάμεσα στο υπόλοιπο διάσπαρτο DNA(junk DNA) και τα μεταθετά στοιχεία,όμως για να είναι λειτουργικά αυτά τα γονίδια, η χρωματίνη οργανώνεται σε πολλαπλά στάδια κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, ώστε

να μπορεί το DNA να αντιγράφεται και τα αντίγραφα να μοιράζονται στα θυγατρικά κύτταρα.



Εικόνα 1: Στάδια συμπίκνωσης του γενετικού υλικού του ανθρώπου. Τα χρωμοσώματα οι πιο ορατές δομές που εμπλέκονται στη μεταφορά της γενετικής πληροφορίας.

Πακετάρισμα του DNA στα χρωμοσώματα:

1. Αρχικά έχουμε την δημιουργία της δομής του νουκλεοσώματος, όπου το DNA περιστρέφεται γύρω από τις ιστόνες
2. Μετέπειτα, τα νουκλεοσώματα σαν χάντρες κομπολογιού συνδέονται με συνδετικό DNA
3. Στο τρίτο επίπεδο συμπίκνωσης έχουμε πακετάρισμα των νουκλεοσωμάτων σε ινίδια χρωματίνης 30nm
4. Στο τελευταίο επίπεδο πακεταρίσματος έχουμε την δημιουργία θηλιών.

Κάθε χρωμόσωμα περιέχει πολλές θέσεις έναρξης αντιγραφής που φαίνονται σαν θηλιές στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Τα χρωμοσώματα και το DNA συνήθως πακετάρονται με τη μορφή της ίνας των 30nm. Κάθε ιστόνη πακετάρεται στο νουκλεόσωμα μέσω του καρβοξυ-τελικού της άκρου, το οποίο έχει μια χαρακτηριστική διαμόρφωση γνωστή ως «ιστονική αναδίπλωση», ενώ το αμινοτελικό της άκρο προεξέχει από το νουκλεόσωμα και υπόκειται πολύ συχνά σε μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Οι τροποποιήσεις αυτές παίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση της χρωματινικής δομής αλλά και στη γονιδιακή έκφραση.¹

Το DNA του ανθρώπινου γονιδιώματος μπορεί να είναι:

- Μοναδιαίο, μη επαναλαμβανόμενο (σε αυτό το ποσοστό συμπεριλαμβάνονται και το ποσοστό των γονιδίων στο γονιδίωμα)
- Επαναλαμβανόμενο (μικροδορυφορικό DNA, μεταθετά στοιχεία όπως SINEs και LINEs)
- Κεντρομερικό (ειδικές αλληλουχίες που αλληλεπιδρούν με τον σκελετό του κυττάρου)
- Τελομερικό (ειδικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στα άκρα των χρωμοσωμάτων, που παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή και σταθερότητα του DNA).²

Ιστόνες

Η χρωματίνη συναντάται σε 2 μορφές, την ετεροχρωματίνη(συμπυκνωμένη χρωματίνη) και την ευχρωματίνη (αποσυμπυκνωμένη χρωματίνη).Στο πλαίσιο της γονιδιακής έκφρασης, για την μεταγραφική ενεργοποίηση συνήθως χρειάζεται ανάπλαση της χρωματίνης. Η ανάπλαση της χρωματίνης επιτυγχάνεται μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων.

Η ανακάλυψη του νουκλεοσώματος ³ και ο χαρακτηρισμός του ως βασική μονάδα οργάνωσης της χρωματίνης ⁴οδήγησε σε εκτεταμένη μελέτη σχετικά με τη σύσταση και τις ιδιότητες του. Η βιοχημική ανάλυση χαρακτηρίζει το νουκλεόσωμα ως ένα οκταμερές αποτελούμενο από 4 διαφορετικά είδη ιστονών με διπλή αντιπροσώπευση γύρω από το οποίο περιελίσσονται 146 ζεύγη βάσεων DNA.

Οι ιστόνες είναι γνωστές από το 1884 και χαρακτηρίστηκαν από τον Albrecht Kossel. Όλα τα μέλη της οικογένειας των ιστονών είναι μικρά με μοριακό βάρος 10-12 kDa και το pΗ τους είναι ουδέτερο, καθώς είναι πλούσιες σε κατάλοιπα λυσίνης και ιστιδίνης, τα οποία φέρουν θετικό φορτίο. Όλοι οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί περιέχουν ιστόνες οι οποίες έχουν χωριστεί σε 5 είδη ανάλογα με τα χαρακτηριστικά τους και είναι οι H1,H2A,H2B,H3 και H4.

Πειράματα *in vitro* ανασύστασης του νουκλεοσώματος με ανασυνδυασμένες ιστόνες και DNA αλλά και κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ ⁵, έδειξαν την συμμετοχή των ιστονών στο πακετάρισμα του νουκλεοσώματος. Πιο αναλυτικά οι H3-H4 σχηματίζουν ένα ετεροδιμερές και έπειτα ένα τετραμερές γύρω από το οποίο περιελίσσονται τα δύο διμερή H2A-H2B. Οι βάσεις του DNA κάθε ιστόνης σχηματίζουν 2 στροφές γύρω από το οκταμερές των ιστονών αλλά ανάλογα με το είδος του DNA, διαφορετικός αριθμός ζευγών βάσεων εμπεριέχεται σε κάθε στροφή. Η ιστόνη H1 αλληλεπιδρά με το συνδετικό DNA και σταθεροποιεί τα νουκλεοσώματα το ένα κοντά στο άλλο. Τα νουκλεοσώματα σχηματίζονται αμέσως μετά την αντιγραφή του DNA.Οι N-τελικές ουρές των ιστονών είναι ευέλικτες και προεξέχουν από το νουκλεόσωμα, προβάλλοντας ανάμεσα από τις στροφές του DNA.

Η τροποποίηση των ουρών των ιστονών επηρεάζει την ικανότητα των συστοιχιών των νουκλεοσωμάτων να σχηματίζουν πιο κατασταλτική δομή χρωματίνης ανώτερης τάξης, καθώς οι αμινοτελικές ουρές είναι απαραίτητες για το σχηματισμό της ίνας των 30 nm και η τροποποίηση των ουρών διαμορφώνει αυτή τη λειτουργία. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η ακετυλίωση της αμινοτελικής ουράς της ιστόνης H4, όπου έχει ως αποτέλεσμα Να παρεμποδίζει τα νουκλεοσώματα να ενσωματώνονται στην κατασταλτική ίνα των 30 nm. Ο σχηματισμός αυτής της ίνας διευκολύνεται από μια αλληλεπίδραση της αμινοτελικής ουράς της ιστόνης H4 και της αρνητικά φορτισμένης επιφάνειας της επικράτειας πτύχωσης των ιστονών της H2A. Έτσι, η ακετυλίωση παρεμποδίζει αυτή την ένωση, αλλάζοντας το φορτίο της ουράς της H4. ^{6 7}

Μεταγραφικοί παράγοντες

Οι μεταγραφικοί παράγοντες διακρίνονται σε 3 κατηγορίες και δρούν σε συνδυασμό με την RNA πολυμεράση II, ενώ οι αλληλεπιδράσεις με την διπλή έλικα του DNA γίνεται χωρίς αυτή να χρειάζεται να αποελικωθεί. Οι πρωτεΐνες-μεταγραφικοί παράγοντες αναγνωρίζουν τη μεγάλη έλικα του DNA χρησιμοποιώντας ειδικά δομικά μοτίβα τα οποία ευνοούν τη δημιουργία ιονικών δεσμών, δεσμών υδρογόνου και υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ DNA και πρωτεϊνών.

Στην πρώτη κατηγορία των μεταγραφικών παραγόντων έχουμε εκείνους που είναι απαραίτητοι για την εκκίνηση της σύνθεσης του RNA σε όλους τους υποκινητές, οι λεγόμενοι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες. Οι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες μαζί με την RNA πολυμεράση σχηματίζουν ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών που αποτελούν την βασική μεταγραφική μονάδα, η οποία περικυκλώνει το σημείο έναρξης της μεταγραφής.

Στην δεύτερη κατηγορία έχουμε τους μεταγραφικούς παράγοντες που έχουν την ικανότητα αναγνώρισης και ειδικής πρόσδεσης σε μικρές ακολουθίες DNA που βρίσκονται πριν από το σημείο έναρξης της μεταγραφής. Οι πρωτεΐνες αυτές εκφράζονται διαρκώς και μπορούν να δράσουν σε οποιονδήποτε υποκινητή φέρει την κατάλληλη θέση πρόσδεσης που αναγνωρίζουν. Ρόλος τους είναι να αυξήσουν την αποτελεσματικότητα της έναρξης της μεταγραφής.

Στην τρίτη κατηγορία έχουμε τους επαγόμενους μεταγραφικούς παράγοντες, οι οποίοι έχουν ρυθμιστικό ρόλο. Αυτοί ενεργοποιούνται την κατάλληλη χρονική στιγμή στους διάφορους ιστούς, οπότε μέσω της δράσης τους ρυθμίζεται το πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης στον τόπο και στον χρόνο.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες έχουν δύο δομικές περιοχές. Η μια περιοχή αναγνωρίζει την αλληλουχία του DNA, ενώ η δεύτερη περιοχή δρα ως ρυθμιστής της γονιδιακής έκφρασης αλληλεπιδρώντας είτε με άλλες πρωτεΐνες είτε με άλλες περιοχές του γονιδιώματος. Επίσης οι μεταγραφικοί παράγοντες διευκολύνουν την διαδικασία της μεταγραφής αλληλεπιδρώντας με άλλες πρωτεΐνες αλλάζοντας την αρχιτεκτονική της χρωματίνης όπου είναι πακεταρισμένο το DNA. Αξίζει να αναφέρουμε ότι οι αλλαγές στην δομή της χρωματίνης παίζουν καθοριστικό ρόλο στην γονιδιακή ρύθμιση.⁸

Ένα από τα πιο βασικά χαρακτηριστικά τους είναι ότι προσδένονται στο DNA και δρούν με συνέργεια και συνεργατικότητα. Με την έννοια της συνεργατικότητας έχουμε μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης του DNA από δύο ή περισσότερες πρωτεΐνες που μεμονωμένα η καθεμία έχει ασθενή συγγένεια πρόσδεσης⁹.

Έτσι οι μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να προσδένονται στο DNA σχηματίζοντας σύμπλοκα και στρατολογώντας έπειτα και άλλες πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την δράση των μεταγραφικών ενζύμων.

Με την συνέργεια πολλοί διαφορετικοί παράγοντες αναγνωρίζουν διαφορετικές ρυθμιστικές αλληλουχίες και πρωτεΐνες του ίδιου γονιδίου και προσδένονται αντίστοιχα ώστε ο ρυθμός της μεταγραφής να επηρεάζεται πολύ πιο έντονα από ότι ο κάθε παράγοντας ατομικά. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το σύμπλοκο που δημιουργείται πριν την μεταγραφή, το οποίο αποτελεί σημείο πολλών πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων με αποτέλεσμα την αύξηση της

μεταγραφικής ισχύς. Η έκφραση των περίπου 30000 γονιδίων του ανθρώπου επιτυγχάνεται μέσω της αξιοποίησης περιορισμένου αριθμού ρυθμιστικών πρωτεϊνών. Η πρόσδεση πρωτεϊνών σε στοιχεία του DNA έχει ως αποτέλεσμα την επιλεκτική γονιδιακή έκφραση, ως κατάληξη της μεταγωγής σημάτων από το κυτταρόπλασμα. Οι περιοχές του γενετικού υλικού που ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση περιέχουν πληροφορίες οι οποίες κληρονομούνται στους απογόνους μέσω της αντιγραφής, δεν μεταφέρονται στο mRNA, αλλά μεταφέρονται σε ανώτερο ρυθμιστικό επίπεδο, καθώς επηρεάζουν τη δράση των μεταγραφικών παραγόντων.

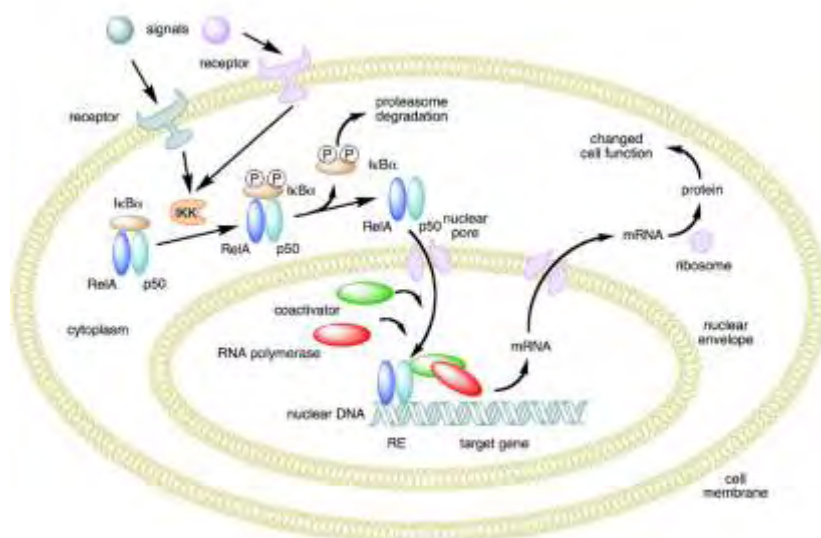
Μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ

Ο NF-κΒ ήρθε στο προσκήνιο ως παράγοντας του πυρήνα ικανός να προσδένεται στον ενισχυτή του γονιδίου της ελαφριάς αλυσίδας και των ανοσοσφαιρινών¹⁰. Οι πρωτεΐνες NF-κΒ ή Rel είναι συντηρημένες σε ένα αρκετά ευρύ φάσμα οργανισμών¹¹, ενώ παράλληλα αποτελούν εξαιρετικά σημαντικούς επαγόμενους μεταγραφικούς παράγοντες που ενεργοποιούνται από πολλά και διαφορετικά ερεθίσματα με αποτέλεσμα να μεταφέρονται στον πυρήνα και να ενεργοποιούν με την σειρά τους συγκεκριμένα γονίδια-στόχους.

Συνήθως αποτελείται από το διμερές p65-p50, αλλά μπορούν να υπάρξουν ετεροδιμερή με συνδυασμούς 5 διαφορετικών υπομονάδων της οικογένειας του NF-κΒ. Προσδένονται στο DNA σε αλληλουχίες 9-11 βάσεων τις λεγόμενες κΒ-sites, οι οποίες είναι αρκετά εκφυλισμένες. Πάνω από 400 γονίδια έχουν χαρακτηριστεί ως άμεσοι μεταγραφικοί στόχοι των διμερών του NF-κΒ.

Αξίζει να αναφέρουμε ότι η κινητική του NF-κΒ διαφέρει από κυτταρικό τύπο σε κυτταρικό τύπο και ανάλογα με το είδος του ερεθίσματος σε κάποια γονίδια προσδένεται κατευθείαν μετά την είσοδο του στον πυρήνα, ενώ σε άλλα μπορεί και ώρες αργότερα, ανάλογα με τις θέσεις ισχυρής πρόσδεσης που είναι διαθέσιμες στους υποκινητές και τους ενισχυτές των γονιδίων. Ένα παράδειγμα που επιβεβαιώνει την παραπάνω θεωρία είναι πως η στρατολόγηση του NF-κΒ στον υποκινητή της IL-6 στα μακροφάγα συμβαίνει 2 ώρες μετά την επαγωγή από τον λιποσακχαρίτη, ενώ στους ινοβλάστες έχουμε αμέσως στρατολόγηση του¹².

Η ενεργοποίηση του NF-κΒ επιτυγχάνεται μέσω των υποδοχέων TNFR, Toll (TLRs) και των κυτταροπλασματικών υποδοχέων RIG-I και MDA-S. Η διαδικασία που ακολουθείται μετά την απόκριση του υποδοχέα στα διάφορα ερεθίσματα (εισβολή βακτηρίων, μυκήτων στον οργανισμό, ενδοκυτταρικά παράσιτα, αναγνώριση αντιγόνου από υποδοχείς του ανοσοποιητικού) είναι η φωσφορυλίωση του αναστολέα του NF-κΒ, η ουβικουιτίνωση του με σκοπό την αποικοδόμησή του και η μετανάστευση των απελευθερωμένων διμερών στον πυρήνα όπου και δρουν ρυθμίζοντας την έκφραση γονιδίων-στόχων.



Εικόνα 2: Μηχανισμός δράσης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB

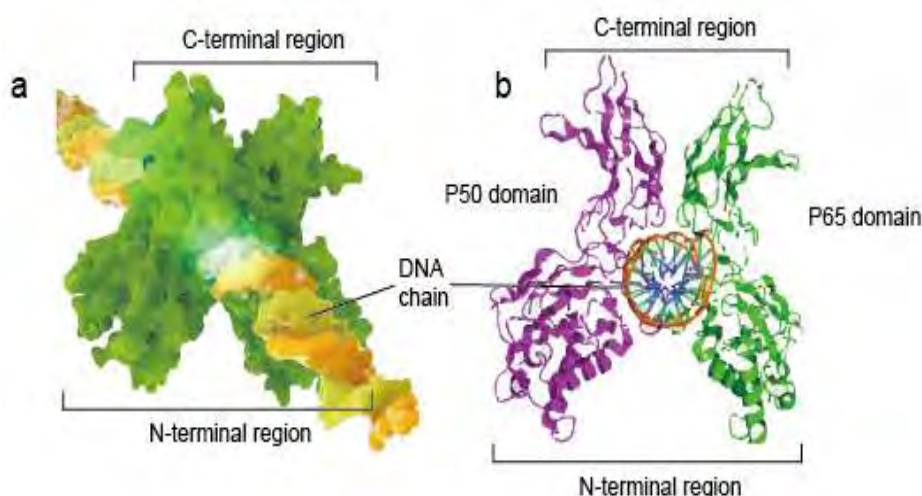
Σε μη διεγερμένα κύτταρα τα διμερή του NF-κB βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα δεσμευμένα από μια οικογένεια αναστολέων που ονομάζονται πρωτεΐνες IκBs (Inhibitor of κB). Αυτές περιέχουν πολλαπλές επαναλήψεις αλληλουχιών αγκυρίνης. Με την βοήθεια αυτών των αλληλουχιών οι IκB δεσμεύουν τις περιοχές του NF-κB που δέχονται τα σήματα για την μεταφορά του στον πυρήνα (nuclear localization signals NLS) και έτσι παραμένει ανενεργός στο κυτταρόπλασμα¹³.

Η κλασσική οδός ενεργοποίησης του NF-κB ξεκινά από τα σήματα που προκαλούν την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών IκB. Τα σήματα αυτά μπορεί να είναι ο TNFα, ελεύθερες ρίζες (ROS), βακτηριακοί λιποσακχαρίτες (LPS), γενετικό υλικό ιών και άλλα. Αυτά τα σήματα ενεργοποιούν ενδομεμβρανικούς ή και ενδοκυτταρικούς υποδοχείς (πχ: TLRs, TNFs) που με τη σειρά τους ενεργοποιούν άλλους παράγοντες όπως οι TRAFs και RIP. Αυτοί στην συνέχεια ενεργοποιούν την κίνηση IKK (IκB kinase). Δεν είναι απολύτως ξεκάθαρο πως γίνεται η ενεργοποίηση της αλλά περιλαμβάνει την φωσφορυλίωση δύο καταλοίπων σερίνης (Ser 177 και 181 για την IKKβ, και Ser 176 και 180 για την IKKα) που βρίσκονται σε έναν βρόγχο ενεργοποίησης¹⁴.

Η IKK φωσφορυλιώνει δύο κατάλοιπα σερίνης στην ρυθμιστική περιοχή της IκB. Στην IκBα του ανθρώπου φωσφορυλιώνονται τα κατάλοιπα σερίνης 32 και 36. Η φωσφορυλίωση ενεργοποιεί την ουβικιτινίωση της IκBα (στην λυσίνη 48) την αποκόλληση της από το ετεροδιμερές p50/RelA(p65) και την αποικοδόμηση της στο πρωτεάσωμα.

Με την αποκόλληση της IκBα πλέον ο NF-κB μπορεί να μεταφερθεί στον πυρήνα όπου προσδένεται σε ειδικές αλληλουχίες του DNA που ονομάζονται RE (response elements). Τότε μπορεί να δράσει ως μεταγραφικός παράγοντας και να επάγει την μεταγραφή. Ο NF-κB επάγει την έκφραση της IκBα η οποία με τη σειρά της δεσμεύει πάλι τον NF-κB και τον καθιστά ανενεργό. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται μια θηλιά ανατροφοδότησης που εξασφαλίζει ότι ο NF-κB θα

βρίσκεται και θα δρα στον πυρήνα μόνο μετά από ειδικό σήμα ενεργοποίησης του¹⁵.



Εικόνα 3: Βλέπουμε σε τρισδιάστατη δομή τα 2 ετεροδιμερή του NF-κΒ. Οι N-τελικές επικράτειες των 2 μονομερών επισυνάπτουν επαφές με τις βάσεις του DNA και οι C-τελικές επικράτειες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και είναι για διμερισμό, ενώ και οι 2 σχηματίζουν μη ειδικές επαφές με το σακχαροφωσφορικό σκελετό του DNA.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες IRFs

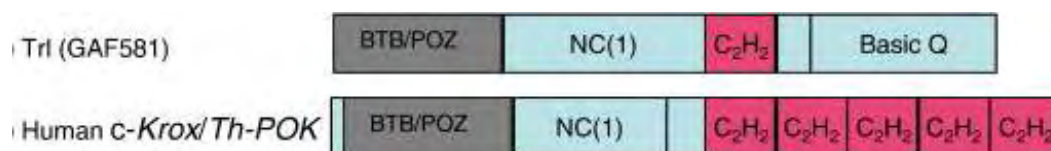
Οι μεταγραφικοί παράγοντες IRFs παίζουν καθοριστικό ρόλο στην δημιουργία του ενισχυοσώματος. Χαρακτηρίζονται από μια καλά διατηρημένη αμινοτελική περιοχή πρόσδεσης στο DNA με πέντε επαναλήψεις τρυπτοφάνης. Η περιοχή αυτή σχηματίζει μια δομή έλικας-στροφής-έλικας και αναγνωρίζει συγκεκριμένες ακολουθίες DNA, που περιέχουν το μοτίβο GAAA. Τα IRFs αποτελούνται από 9 μέλη (IRF1-IRF9)^{16 17}. Μελέτες έδειξαν ότι οι IRF1, IRF3, IRF5 και IRF7 συμμετέχουν στην μεταγραφική ρύθμιση της IFN-β, ως ενεργοποιητές¹⁸. Ο ρόλος του IRF1 στη μεταγραφική ενεργοποίηση της IFN-β δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, καθώς, knock-out ποντίκια *irf-1* εξακολουθούν να αποκρίνονται σε ιική μόλυνση, χωρίς πρόβλημα. Από την άλλη ο IRF5, δεν είναι απαραίτητος για την επαγωγή του γονιδίου της ιντερφερόνης από τον ιό, αλλά ρυθμίζει παράλληλα την έκφραση άλλων γονιδίων που κωδικοποιούν κυτοκίνες φλεγμονής, όπως την IL-12 και τον TNFα. Έχει αποδειχθεί ότι η πρόσδεση ενός IRF παράγοντα προκαλεί μια παραμόρφωση στη δομή του DNA, η οποία επιτρέπει την συνεργατική πρόσδεση ενός δεύτερου παράγοντα IRF ή την συνεργατική στρατολόγηση άλλων μεταγραφικών παραγόντων, όπως στην περίπτωση του ενισχυοσώματος της IFN-β.

Ο IRF7 είναι πιο σημαντικός από τον IRF3, για την ιό-επαγόμενη έκφραση των ιντερφερονών. Η έκφραση του γονιδίου του IRF7 εξαρτάται απόλυτα από την επαγωγή με IFN-α/β και ο χρόνος ημιζωής της πρωτεΐνης IRF7 είναι πολύ σύντομος, επειδή υφίσταται γρήγορα ουβικιτιλίωση και μετέπειτα αποδόμηση από το

πρωτεόσωμα. Αυτή η ασταθής και ευμετάβλητη φύση του IRF7 καθιστά ολόκληρη τη διαδικασία ενεργοποίησης των γονιδίων των ιντερφερονών προσωρινή και ευέλικτη σε εξωτερικές μεταβολές, ώστε να προλαμβάνεται πιθανή υπερέκφραση, που θα ήταν επιβλαβής για το κύτταρο. Όμως τα συνεχή, έστω και μικρά, επίπεδα έκφρασης του IRF7, πυροδοτούν με τη σειρά τους την θετική ανατροφοδότηση μετά από πιθανή ιική μόλυνση. Επιπλέον αξίζει να αναφέρουμε ότι όπως και ο NF- κB έτσι και ο IRF7 βρίσκονται σε πολύ χαμηλά επίπεδα ενδοκυτταρικά κάτι το οποίο αποδεικνύει το γιατί συμμετέχει σε μια στοχαστική αλληλεπίδραση, ενώ επιπλέον πειράματα έχουν δείξει ότι μετά από ιική μόλυνση και εισαγωγή IRF7 υπήρξε 55% αύξηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου της IFN-β¹⁹, γεγονός που επιβεβαιώνει τον κομβικό του ρόλο στην αντική μεταγραφική απόκριση.

Ο μεταγραφικός παράγοντας ThPOK

Η πρωτεΐνη GAGA στην *Drosophila Melanogaster* (GAF) κωδικοποιείται από το γονίδιο Trl (Tithorax-like) και είναι ένας πολύ σημαντικός μεταγραφικός παράγοντας για τη διαμόρφωση της δομής της χρωματίνης. Η αρχιτεκτονική της συνδυάζει 3 διαφορετικές δομικές επικράτειες, μια BTB/POZ επικράτεια που φέρει ευθύνη για πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και ολιγομερισμό και βρίσκεται στις N-τελικές περιοχές, στην C-τελική περιοχή φέρει δάκτυλο ψευδαργύρου που είναι υπεύθυνος για πρόσδεση DNA και μια περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα γλουταμίνης. Επίσης υπάρχει και μια περιοχή συνδέτη, μη-δομική όπου είναι στόχος μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων²⁰. Βιοχημικές μελέτες έδειξαν ότι αυτή η πρωτεΐνη προσδένεται σε πολλούς ενισχυτές και υποκινητές γονιδίων της *Drosophila*. Επίσης η πρωτεΐνη GAF σχετίζεται έμμεσα με την βασική μεταγραφική μονάδα, καθώς είναι θετικός ρυθμιστής του γονιδίου Ubx, το οποίο αλληλεπιδρά άμεσα με έναν παράγοντα του συμπλέγματος TFIIID. Επιπρόσθετα, ο μεταγραφικός παράγοντας GAGA της *Drosophila Melanogaster* σταθεροποιεί τον παράγοντα Rho στη χρωματίνη και έτσι συμμετέχει έτσι στην μεταγραφική αποσιώπηση στα PREs, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη στρατολόγηση των συμπλεγμάτων PcG (Polycomb-group proteins), τα οποία αποσιωπούν τα γονίδια Hox με αναδιαμόρφωση της χρωματίνης κατά την εμβρυική ηλικία στην *Drosophila Melanogaster*. Η ομόλογη πρωτεΐνη του στα θηλαστικά είναι ο c-Krox/ThPOK.



Εικόνα 4: Δομή της πρωτεΐνης GAF στην *Drosophila Melanogaster* και της ανθρώπινης πρωτεΐνης c-Krox/ThPOK

Αρχικά, ο ThPOK χαρακτηρίστηκε ως μεταγραφικός ρυθμιστής των γονιδίων κολλαγόνου τύπου I, που εκφράζονται στο δέρμα, ενώ προσδένεται συνήθως στον υποκινητή των γονιδίων του κολλαγόνου και η αλληλουχία 5-GGGAGGG-3 αποτελεί θέση πρόσδεσης για αυτόν^{21 22 23}. Πιο συγκεκριμένα έχει αποδειχθεί ότι στρατολογεί την υπομονάδα p65 του NF-κΒ, ενώ παράλληλα ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του κολλαγόνου τύπου I²⁴. Η έκφραση του ThPOK σε ανώριμα T-κύτταρα, των οποίων η μοίρα είναι να ωριμάσουν σε κυτταροτοξικά CD8+ κύτταρα, έχει ως αποτέλεσμα την μετατροπή τους σε CD4+²⁵. Αυτή η ανακατεύθυνση σε CD4+ κύτταρα γίνεται επειδή ο ThPOK καταστέλλει την πρωτεΐνη RUNX3 και Blimp1, οι οποίες συμβάλλουν καθοριστικά στην ανάπτυξη των CD8+ T-κυττάρων, καθώς δεσμεύονται σε περιοχές της χρωματίνης εντός ή πλησίον αυτών των γονιδίων²⁶. Από την άλλη οι παράγοντες RUNX1 και RUNX3 εμποδίζουν την έκφραση του γονιδίου του ThPOK και του CD4^{27 28}. Επιπρόσθετα, ο ThPOK συμμετέχει στον κυτταρικό κύκλο των ινοβλαστών ποντικού με σύνδεση σε μοτίβα GAGA στον πυρηνικό φάκελο²⁹, ενώ η αποσιώπηση του ThPOK σε μακροφάγα κύτταρα ποντικού εμποδίζει τη μετάβαση από τη μονοαλληλική έκφραση στη δι-αλληλική έκφραση του TNFα³⁰.

Η μεταγραφή του γονιδίου ThPOK σε θυμοκύτταρα ρυθμίζεται κυρίως από ένα απομακρυσμένο στοιχείο (DRE), που είναι απαραίτητο και για την καταστολή του στα CD8 + αλλά και για την έκφραση του στα CD4+³¹. Ένας πιθανός μοριακός μηχανισμός που περιγράφεται από τους³² δείχνει πως η χρωμοσωμική τοποθέτηση και η πυρηνική οργάνωση ρυθμίζουν την έκφραση των CD4 και CD8 κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, οι γενωμικοί τόποι των CD4 και CD8 συνεργάζονται μεταξύ τους σε cis-διάταξη. Αυτή η ένωση των 2 τόπων που γίνεται με τη βοήθεια του παράγοντα CBFβ σε συνεργασία με τις πρωτεΐνες RUNX³³ διευκολύνει την έκφραση CD8, ενώ ο ThPOK παρεμποδίζει αυτή την αλληλεπίδραση ρυθμίζοντας την έκφραση των CD4, παίζοντας ενεργό ρόλο στις χρωμοσωμικές σχέσεις.

Ιντερφερόνες (IFNs)

Οι κυτοκίνες είναι ρυθμιστικές πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους, που εκκρίνονται από λευκοκύτταρα και διάφορους άλλους κυτταρικούς τύπους του σώματος ως απόκριση σε ένα πλήθος ερεθισμάτων. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για τη ρύθμιση της ανάπτυξης των ανοσοδραστικών κυττάρων. Κατηγορίες κυτοκινών είναι οι ιντερλευκίνες, οι παράγοντες νέκρωσης όγκου, οι ιντερφερόνες και οι χημειοκίνες.

Οι ιντερφερόνες, είναι ειδικές κυτοκίνες που έχουν την δυνατότητα να εμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των ιών στα κύτταρα και διαιρούνται σε 3 διακριτούς τύπους (I, II, III). Οι ιντερφερόνες τύπου I (IFN-α, IFN-β) εκφράζονται σε πολλούς κυτταρικούς τύπους ως απόκριση σε μόλυνση από ιό, ενώ παίζουν καταλυτικό ρόλο στην μη ειδική άμυνα. Η IFN-α παράγεται στα λευκοκύτταρα που έχουν μολυνθεί από ιό ενώ η IFN-β από ινοβλάστες μετά από ιική μόλυνση. Οι ιντερφερόνες τύπου II περιλαμβάνουν μόνο την IFN-γ, η οποία κωδικοποιείται από ένα και μοναδικό γονίδιο και εκφράζεται μόνο σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (T- λεμφοκύτταρα και NK-κύτταρα). Γενικά, οι ιντερφερόνες δεν έχουν

μόνο αντική δράση, αλλά συμμετέχουν σε διάφορες βιολογικές δράσεις όπως η αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης, η αναστολή των ανοσοκατασταλτικών επιδράσεων, η ενίσχυση των μακροφάγων, η ενίσχυση των φυσικών φονικών κυττάρων, των ουδετερόφιλων και διέγερση της κυτταρικής διαφοροποίησης. Η ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας τα τελευταία χρόνια επέτρεψε την παραγωγή τεράστιων ποσοτήτων των μορίων IFN-α, IFN-β και IFN-γ μετά από κλωνοποίηση γονιδίων. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα να χρησιμοποιηθούν κλινικά. Η IFN-α χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ηπατίτιδας C και B, ενώ τυγχάνει διάφορων εφαρμογών στην θεραπεία καρκίνου (λευχαιμία εκ τριχωτών κυττάρων). Η IFN-β συμβάλλει στην βελτίωση της εικόνας ασθενών που πάσχουν από σκλήρυνση κατά πλάκας, ενώ η IFN-γ βρίσκει εφαρμογή στη θεραπεία διάφορων τύπων κακοήθειας (δερματικό T-κυτταρικό και το πολλαπλό μύελωμα), ενώ είναι πολύ αποτελεσματική στη θεραπεία της χρόνιας κοκκιωματώδους νόσου (CGD) και ως εκ τούτου υπάρχει σθεναρή ικανότητα των φαγοκυττάρων να καταστρέφουν τα μικρόβια.³⁴ Η πρώτη γραμμή της αντι-ιικής άμυνάς μας βασίζεται στην παραγωγή και στην έκκριση ιντερφερονών τύπου I, οι οποίες στη συνέχεια προσδένονται σε ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια μολυσμένων και μη κυττάρων ενεργοποιώντας με αυτό τον τρόπο έναν αρκετά μεγάλο αριθμό γονιδίων με αντική δράση. Η έκφραση αυτών των γονιδίων έχει ως αποτέλεσμα να προλαμβάνεται η εισβολή και πολλαπλασιασμός των ιών μέσα στα κύτταρα.

Η ιντερφερόνη β (IFN-β) είναι μια σηματοδοτική πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των κυτοκινών, και είναι Ιντερφερόνη τύπου I. Εκφράζεται από όλους σχεδόν τους κυτταρικούς τύπους σε μεγάλες ποσότητες από τους ινοβλάστες και η δράση της είναι παρακρινής. Κύτταρα που μολύνονται από κάποιο μόριο που μπορεί να επάγει την μονοπάτια παραγωγής ιντερφερόνης τελικά αποπύπτουν. Η πρόσδεσή της, όμως, σε υποδοχείς γειτονικών κυττάρων τα καθιστά ανθεκτικά στην ιική μόλυνση. Η τελευταία είναι και το μοναδικό ερέθισμα που μπορεί να ενεργοποιήσει το γονίδιο της ιντερφερόνης β στον άνθρωπο³⁵. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την IFN-β βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9p21.

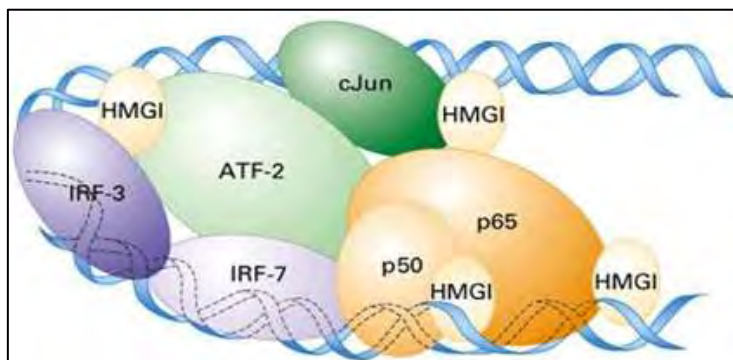
Ενισχύσωμα της IFN-β

Οι υποκινητές των ευκαρυωτικών οργανισμών δεν λειτουργούν απαραίτητα μόνοι τους. Τουλάχιστον σε κάποιες περιπτώσεις η δράση ενός υποκινητή αυξάνεται κατά πολύ από την παρουσία ενός ενισχυτή (enhancer). Ο ενισχυτής είναι μία μικρή αλληλουχία DNA (50-1500 bp) ο οποίος αποτελείται από ένα άλλο σύνολο στοιχείων τοποθετημένων όμως σε μεταβλητή απόσταση από τα στοιχεία του υποκινητή. Σε αυτόν προσδένονται μεταγραφικοί παράγοντες για να διευκολύνουν την μεταγραφή.

Η μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων ιντερφερόνης τύπου I σηματοδοτεί την ανθρώπινη αντική απόκριση, η οποία οδηγεί σε παραγωγή και έκκριση ιντερφερονών που προσδένονται στους υποδοχείς IFN τύπου I μολυσμένων και μη κυττάρων με αποτέλεσμα την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού αντικών γονιδίων.

Ο ενισχυτής της IFN-β είναι ένα πολύ καλά μελετημένο μοντέλο συνδυαστικής πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων με συνέργεια και

συνεργατικότητα. Ο ενισχυτής της IFN-β βρίσκεται μεταξύ των θέσεων -110 και -45, ανοδικά του υποκινητή του αντίστοιχου γονιδίου και περιέχει θέσεις πρόσδεσης για 4 ρυθμιστικά στοιχεία (3 μεταγραφικοί παράγοντες ATF2/C-Jun, NF-κB, IRFs και μια πρωτεΐνη υψηλής κινητικότητας την HMGI(Y)). Το καθένα ρυθμιστικό στοιχείο ατομικά μπορεί να ενεργοποιηθεί από διάφορα ερεθίσματα-σήματα, όμως το ενισχυόσωμα στον ενισχυτή της ιντερφερόνης β δημιουργείται μόνο μετά από ιική μόλυνση.



Εικόνα 5: Το ενισχυόσωμα του γονιδίου της IFN-β. Thanos and Maniatis, 1995

Οι πρώτες *in vitro* μελέτες δέσμευσης του DNA έδειξαν πως η πρωτεΐνη HMGI(Y) δεσμεύει τα στοιχεία PRDII και PRDIV, οι οποίες είναι περιοχές του ενισχυτή, μέσω της μικρής αύλακας, ενώ οι ATF2/C-Jun και NF-κB προσδένονται στην συγκεκριμένη περιοχή μέσω της μεγάλης αύλακας της HMGI(Y)³⁶. Πιο συγκεκριμένα, το διμερές ATF2/C-Jun προσδένεται στην αλληλουχία 5'-TGACATAG-3' με την υπομονάδα ATF2 να εντοπίζεται στο 5' άκρο ενώ η υπομονάδα C-Jun στο 3' άκρο. Ο NF-κB προσδένεται στις κB περιοχές στο στοιχείο PRDII³⁷. Δύο μόρια IRF-3 προσδένονται στο στοιχείο PRDIII, το ένα στην αλληλουχία 5'-TAGGAAAA-3' και το άλλο στην αλληλουχία 5'-AACTGAAA-3'. Τα επίπεδα του IRF-3 παραμένουν συνεχώς σταθερά, ενώ του IRF-7 που είναι απαραίτητο για την δημιουργία του ενισχυοσώματος είναι αρκετά χαμηλά και η έκφραση του αυξάνεται από τον ανατροφοδοτικό κύκλο της παραγωγής IFN-β. Όσον αφορά την πρωτεΐνη HMGI(Y) η οποία προσδένεται σε τέσσερις περιοχές στον ενισχυτή πιστεύεται ότι διευκολύνει την πρόσδεση των άλλων παραγόντων με το να κάμπτεται το DNA και να μειώνει την ελεύθερη ενέργεια που απαιτείται για την πρόσδεση³⁸.

Γνωρίζοντας πλέον πως για την έναρξη της μεταγραφής του γονιδίου της ιντερφερόνης β είναι απαραίτητη η δημιουργία ενός ενισχυοσώματος, νέες μελέτες έφεραν στο φως ένα μοντέλο με το οποίο πραγματοποιείται η συναρμολόγηση του ενισχυοσώματος. Το μοντέλο αυτό βασίζεται σε διαχρωμοσωμικές σχέσεις που οδηγούν σε μονοαλληλική έκφραση του γονιδίου της ιντερφερόνης β μετά από ιική μόλυνση. Στις 2-4 ώρες μετά την ιική μόλυνση έχουμε την πρόσδεση του NF-κB μαζί με τον IRF-1. Ο NF-κB είναι ο πρώτος παράγοντας που προσδένεται στον ενισχυτή³⁹. Έπειτα, προσδένονται οι ATF-2, IRF-3 και c-Jun, ενώ στις 5-6 ώρες προσδένεται ο IRF-7 με αποτέλεσμα να προωθήσει τη συναρμολόγηση του ενισχυοσώματος και παράλληλα την μεταγραφή της IFN-β στα υπόλοιπα αλληλόμορφα που δεν έχουν ενεργοποιηθεί. Ο ATF-2/c-Jun βρίσκεται ήδη στον πυρήνα και είναι σε θέση να προσδεθεί στο DNA σε μη-διεγερμένα κύτταρα. Όμως δεν είναι ικανός να επάγει τη μεταγραφή αν δε φωσφορυλιωθεί η ενεργή περιοχή του από το σηματοδοτικό

μονοπάτι των MAPK κινασών. Επίσης για την σταθερή πρόσδεση του ATF-2/c-Jun στο DNA απαιτείται η συνεργιστική δράση με τους άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Ο IRF-3 εκφράζεται και αυτός συνεχώς σε διάφορους κυτταρικούς τύπους και βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Ενεργοποιείται έπειτα από φωσφορυλίωση σε συγκεκριμένα κατάλοιπα σερίνης και ευνοείται ο διμερισμός του. Με την βοήθεια ειδικών πρωτεϊνών εισέρχεται στον πυρήνα. *In vivo* χαρτογράφηση νουκλεοσωμάτων έδειξε ότι ο ενισχυτής της IFN-β περιστοιχίζεται από 2 νουκλεοσώματα, το ένα από τα οποία καλύπτει το TATA box και την θέση έναρξης της μεταγραφής. Ο ενισχυτής δρα έτσι ώστε να τροποποιήσει το νουκλεόσωμα και να στρατολογήσει την βασική μεταγραφική μονάδα⁴⁰. Μετά τη δημιουργία του ενισχυοσώματος, ο ελεύθερος από νουκλεοσώματα ενισχυτής στρατολογεί τροποποιητές της χρωματίνης και βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες στον κοντινό υποκινητή. Η στρατολόγηση ολοκληρώνεται με την ολίσθηση του νουκλεοσώματος που καλύπτει το βασικό υποκινητή και την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης II για την έναρξη της μεταγραφής. Εξαιτίας μιας ενδογενούς καμπυλότητας που παρουσιάζει το DNA στην περιοχή του ενισχυτή της ιντερφερόνης β, η πρόσδεση των παραγόντων ATF-2/c-Jun και NF-κΒ δεν ευνοείται. Το γεγονός αυτό αναστρέφεται από τον αρχιτεκτονικό πυρηνικό παράγοντα HMGI(Y)⁴¹, μια μικρή χρωματινική πρωτεΐνη που προσδέεται σε περιοχές πλούσιες σε κατάλοιπα A-T από την πλευρά της μικρής αύλακας του DNA⁴². Επιπλέον, η ακετυλίωση της HMGI(Y) από το σύμπλεγμα GCN5 σταθεροποιεί περισσότερο το ενισχυόσωμα⁴³, ενώ η ακετυλίωση της από την CBP/p300 αποσυναρμολογεί το ενισχυόσωμα και τερματίζει την μεταγραφή⁴⁴.

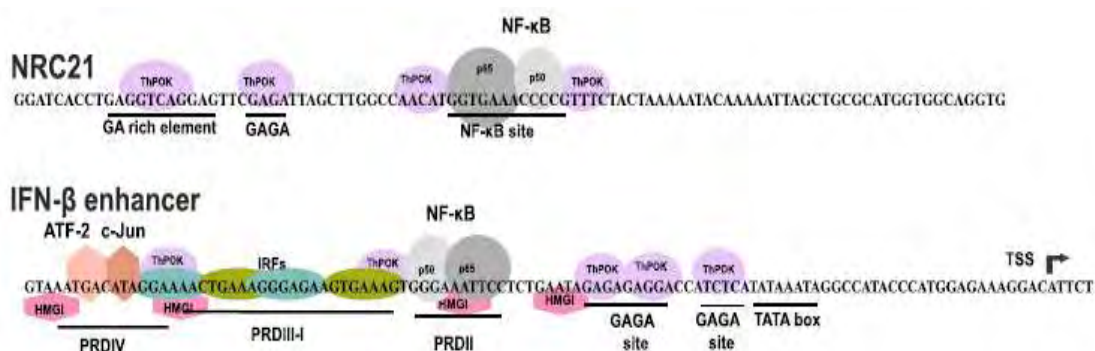
Διαχρωσσωμικές αλληλεπιδράσεις της IFN- β μετά από ιική μόλυνση

Οι NRC περιοχές (NF-κΒ reception centers) είναι Alu-like στοιχεία που προσδέουν τον NF-κΒ και διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στις διαχρωσσωμικές αλληλεπιδράσεις. Τα στοιχεία Alu αποτελούν το 11% του ανθρώπινου γονιδιώματος και ανήκουν σε μια τάξη ρετροϊκών στοιχείων. Κωδικοποιούν έναν μικρό αριθμό RNAs, που μεταγράφονται από την RNA pol III και συμμετέχουν στην μετάθεση ρετροϊκών στοιχείων. Μελέτες έχουν δείξει πως αυτά τα στοιχεία έχουν πολλές θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων και πως είναι πολύ συχνά πηγή νησίδων CpG που μπορεί να επηρεάζουν τη γονιδιακή ρύθμιση κοντινών γονιδίων⁴⁵.

Σύμφωνα με μελέτες που έγιναν στο εργαστήριο όπου πραγματοποίησα την διπλωματική μου εργασία, υπάρχουν τρεις NRC περιοχές (NRC9, NRC14 και NRC21) που εδράζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα (9,18 και 4 αντίστοιχα) και οι οποίες, μετά από ιική μόλυνση, έχουν τη δυνατότητα να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με τον ενισχυτή του γονιδίου της IFN-β και να οδηγούν στην στρατολόγηση του ενισχυοσώματος και τελικώς στην ενεργοποίηση του γονιδίου της IFN-β. Πειράματα FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) έδειξαν πως οι αλληλεπιδράσεις αυτές εμφανίζονται 2 ώρες μετά την ιική μόλυνση, φτάνουν στην κορύφωση τους στις 4 ώρες, ενώ μετά το πέρας 8 ωρών παύουν να υπάρχουν. Μόνο το 20% περίπου των

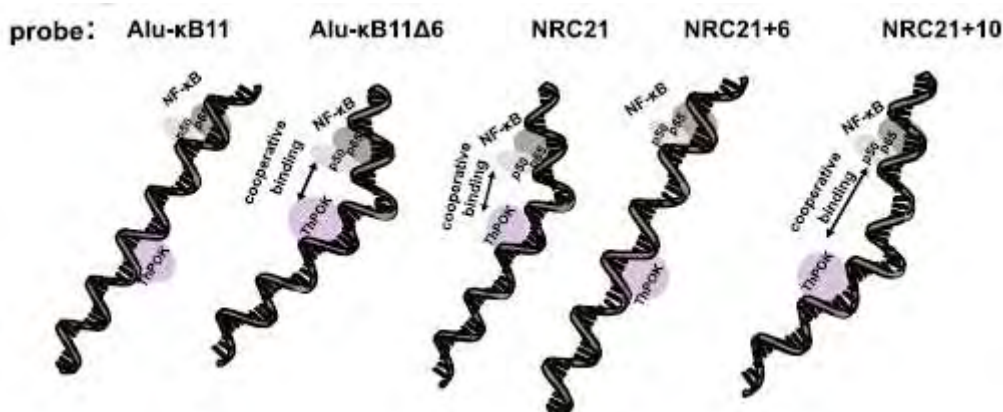
κυττάρων εκφράζουν την IFN-β, μετά από ιική μόλυνση, ενώ στη διαδικασία εμπλέκεται μόνο ένα αλληλόμορφο, δηλαδή η ενεργοποίηση της μεταγραφής της IFN-β είναι μονοαλληλική⁴⁶. Ένα από τα πρώτα συστήματα στα οποία αναφέρθηκαν διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις ήταν τα πρώιμα CD4+ T βοηθητικά λεμφοκύτταρα κατά τη διάρκεια διαφοροποίησής τους σε TH1 και TH2. Η παραγωγή IFN-β έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση της και σε κύτταρα που αρχικά δεν την εκφράζαν, ενώ προκαλεί και υψηλή μεταγραφική ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα IRF-7, ο οποίος διεγείρει τη συναρμολόγηση του ενισχυοσώματος και στα υπόλοιπα αλληλόμορφα, ανεξάρτητα από διαχρωμοσωμικές σχέσεις οδηγώντας έτσι σε έκφραση και από τα δύο αλληλόμορφα και συνεπώς σε ενίσχυση της άμυνας του οργανισμού απέναντι στον ιό.

Από το 2008⁴⁷ είναι γνωστό πως για τη στοχαστική έκφραση του γονιδίου της IFN-β μετά από ιική μόλυνση είναι απαραίτητες οι διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των NRCs και του ενισχυτή του γονιδίου της IFN-β, χωρίς όμως να έχει καθοριστεί ο τρόπος με τον οποίο ο NF-κΒ μεταφέρεται τελικώς στις θέσεις πρόσδεσής του στην περιοχή του ενισχυτή. Σε αυτό το ζήτημα δόθηκε πρόσφατα απάντηση με πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριό μας. Η ιικά επαγόμενη εισαγωγή του NF-κΒ στον πυρήνα και η αλληλεπίδρασή του με τον ThPOK, οδηγεί στη συνεργατική τους πρόσδεση στα NRCs. Ο μεταγραφικός παράγοντας ThPOK είναι αυτός που προσδένεται πρώτος στα NRCs και φέρνει τον NF-κΒ στην θέση πρόσδεσης του ανοδικά του υποκινητή του γονιδίου της IFN-β. Στα NRCs υπάρχουν μοτίβα GAGA, τα οποία είναι θέσεις πρόσδεσης της πρωτεΐνης ThPOK, ενώ εκείνη που βρίσκεται στο 5' άκρο των NRCs είναι η κρίσιμη περιοχή για τις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις. Με πειράματα DNA FISH, χρησιμοποιώντας ειδικούς ανιχνευτές για την IFN-β και τις εκτοπικές περιοχές του NRC21 (οι οποίες φέρουν μεταλλαγές και ελλείψεις), παρατηρήθηκε πως στις κυτταρικές σειρές που φέρουν μεταλλαγή της περιοχής GAGA ή της περιοχής πρόσδεσης NF-κΒ, η IFN-β αλληλεπιδρά σε πολύ χαμηλά ποσοστά, σε σχέση με την αλληλεπίδραση με την μη μεταλλαγμένη περιοχή του NRC21. Η πρόσδεση του ThPOK στην GAGA περιοχή είναι αρκετή για να υπάρχει μια χαλαρή διαχρωμοσωμική αλληλεπίδραση μεταξύ των συγκεκριμένων Alu-στοιχείων και της IFN-β, όμως η ταυτόχρονη πρόσδεση του NF-κΒ καθιστά ισχυρή και σταθερή αυτή την αλληλεπίδραση.



Εικόνα 6: Θέσεις πρόσδεσης των ThPOK και NF-κΒ στον NRC21 και τον ενισχυτή του γονιδίου της IFN-β. Νίκου και Παπαγιάννη, 2018.

Όλα τα Alu-κΒ στοιχεία έχουν θέσεις πρόσδεσης για τον NF-κΒ και ορισμένα περιέχουν θέσεις πρόσδεσης και για τον ThPOK. Ωστόσο, μόνο τα NRCs (NRC9, NRC14 και NRC21) έχουν την δυνατότητα να πραγματοποιήσουν αλληλεπιδράσεις με τον ενισχυτή του γονιδίου της IFN-β. Αυτό συμβαίνει γιατί στα συγκεκριμένα NRCs οι θέσεις πρόσδεσης του NF-κΒ και η περιοχή GAGA βρίσκονται στην ίδια στροφή έλικας, γεγονός που τους προσδίδει την ικανότητα της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης και της συνεργατικής τους πρόσδεσης. Σε Alu-κΒ αλληλουχίες, όπως ο Alu-κΒ11, όπου οι αντίστοιχες θέσεις εδράζονται στην αντίθετη πλευρά της έλικας, δεν υπάρχει αλληλεπίδραση και συνεργατική πρόσδεση. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως η προσθήκη ή η αφαίρεση 6 νουκλεοτιδίων (μισή στροφή έλικας) μεταξύ των θέσεων πρόσδεσης του NF-κΒ και του ThPOK, στις αλληλουχίες του NRC21 και του Alu-κΒ11, αφαιρεί από το NRC21 τη δυνατότητα της συνεργατικής δέσμευσης και της δημιουργίας αλληλεπιδράσεων με τον ενισχυτή του γονιδίου της IFN-β, ιδιότητες που της αποκτά αντιστοίχως Alu-κΒ11, μετατρέποντάς το κατά αυτό τον τρόπο σε NRC.



Εικόνα 7: Η στοίχιση της αλληλουχίας του NRC21 και του Alu-κΒ11 στοιχείου, που μοιάζει με NRC, παρά την ομοιότητα της αλληλουχίας του με το NRC21, δε μπορεί να λειτουργήσει ως NRC. Παρατηρώντας τα μοτίβα πρόσδεσης των δύο πρωτεϊνών βλέπουμε ότι οι θέσεις πρόσδεσης τους στον NRC21 βρίσκονται από την ίδια πλευρά της έλικας, ενώ στο Alu-κΒ11 βρίσκονται σε διαφορετική στροφή της έλικας. Η κύρια διαφορά μεταξύ του NRC21 και του Alu-κΒ11 είναι πως στο Alu-κΒ11 τα σημεία πρόσδεσης του NF-κΒ και του ThPOK είναι στην αντίθετη πλευρά της DNA έλικας. *Nikorouliou and Panagopoulos, 2018.*

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ

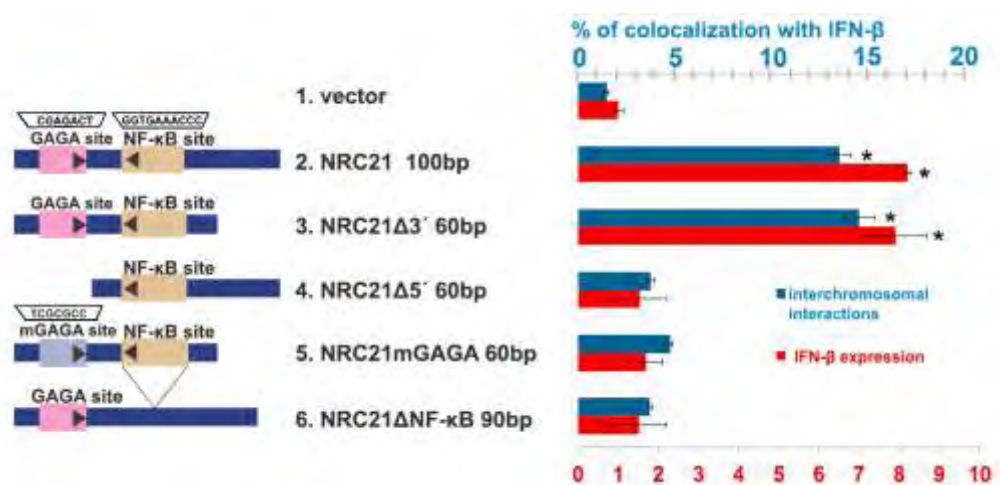
Η ανθρώπινη αντική απόκριση πυροδοτείται από την μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων της ιντερφερόνης τύπου Ι. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της IFN-β απαιτεί έναν ενισχυτή ανοδικά του υποκινητή, ο οποίος περιέχει θέσεις πρόσδεσης για τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-κΒ, IRFs, ATF-2/cJun και την πρωτεΐνη HMGI(Y). Μετά από ιική μόλυνση, με την βοήθεια της πρωτεΐνης HMGI(Y) συνεργάζονται και οι τρεις μεταγραφικοί παράγοντες με αποτέλεσμα τη δημιουργία του ενισχυοσώματος, το οποίο στρατολογεί τροποποιητές της χρωματίνης και βασικούς μεταγραφικούς παράγοντες στον κοντινό υποκινητή. Ένα βασικό χαρακτηριστικό στην έκφραση της IFN-β αλλά και πολλών άλλων γονιδίων κυτταροκινών όπως η IL-2, IL-4, IL-5, IL-13 και IL-10, είναι ότι σε κάθε χρονική στιγμή μόνο ένα ποσοστό των κυττάρων ενός πληθυσμού και ένα αλληλόμορφο εκφράζει το συγκεκριμένο γονίδιο ακόμη και κάτω από τις ευνοϊκότερες συνθήκες.

Στο εργαστήριο όπου πραγματοποίησα την διπλωματική μου εργασία διατυπώθηκε ένα μοντέλο, το οποίο εξηγεί τη στοχαστικότητα της IFN-β. Αυτό το μοντέλο προτείνει ότι η επιλογή του αλληλόμορφου που θα εκφράζεται γίνεται κατόπιν διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων με τρεις διαφορετικούς γενετικούς τόπους. Πειράματα έδειξαν πως και οι τρεις γενετικοί τόποι μπορούν να διαμεσολαβήσουν για την πρόσδεση του παράγοντα NF-κΒ στον ενισχυτή της IFN-β, προωθώντας με αυτό τον τρόπο την συναρμολόγηση του ενισχυοσώματος και κατ' επέκταση την ενεργοποίηση της μεταγραφής από το ένα αλληλόμορφο. Στη συνέχεια η πρωτεΐνη IFN-β επάγει υψηλά επίπεδα έκφρασης του παράγοντα IRF-7, ο οποίος επάγει με τη σειρά του την συναρμολόγηση του ενισχυοσώματος και άρα την μεταγραφή της IFN-β στα υπόλοιπα αλληλόμορφα αλλά και στα κύτταρα που αρχικά δεν εξέφραζαν αυτή την πρωτεΐνη. Έναυσμα των πειραμάτων που οδήγησαν στο συγκεκριμένο μοντέλο αποτέλεσε το γεγονός πως ο NF-κΒ βρίσκεται σε πολύ περιορισμένες ποσότητες στο εσωτερικό των κυττάρων και σε συνδυασμό με το δεδομένο ότι είναι ο πρώτος παράγοντας που προσδένεται στον ενισχυτή της IFN-β, τότε τίθεται ερώτημα που αφορά το μηχανισμό με τον οποίο ο NF-κΒ τοποθετείται ανοδικά του γονιδίου της IFN-β και αποτελεί πυρήνα συναρμολόγησης του ενισχυοσώματός της.

Οι διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις λαμβάνουν χώρα μετά από ιική μόλυνση και ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ προσδένεται σε χρωμοσωμικές περιοχές όπου υπάρχουν ειδικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες Alu, οι οποίες περιλαμβάνουν τη θέση πρόσδεσης του NF-κΒ, (GGGTTTCACC). Αυτές οι στοχαστικές διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των τριών Alu στοιχείων και του ενισχυτή της IFN-β στάθηκε αφορμή, ώστε στο εργαστήριο να προχωρήσουν σε πειράματα που θα αποδεικνύουν το μοριακό μηχανισμό που οδηγεί τον NF-κΒ στα Alu στοιχεία, μελετώντας τα τρία NRCs DNA στοιχεία που αλληλεπιδρούν με την IFN-β.

Με σκοπό να χαρακτηριστεί η ελάχιστη αλληλουχία των NRC στοιχείων που απαιτείται για την αλληλεπίδραση με τον ενισχυτή της IFN-β, κατασκευάστηκαν σταθερές κυτταρικές σειρές σε HeLa κύτταρα που φέρουν είτε την WT ή ελλείψεις ή μεταλλάξεις της αλληλουχίας NRC21 και ελέγχθηκε η ικανότητα τους να

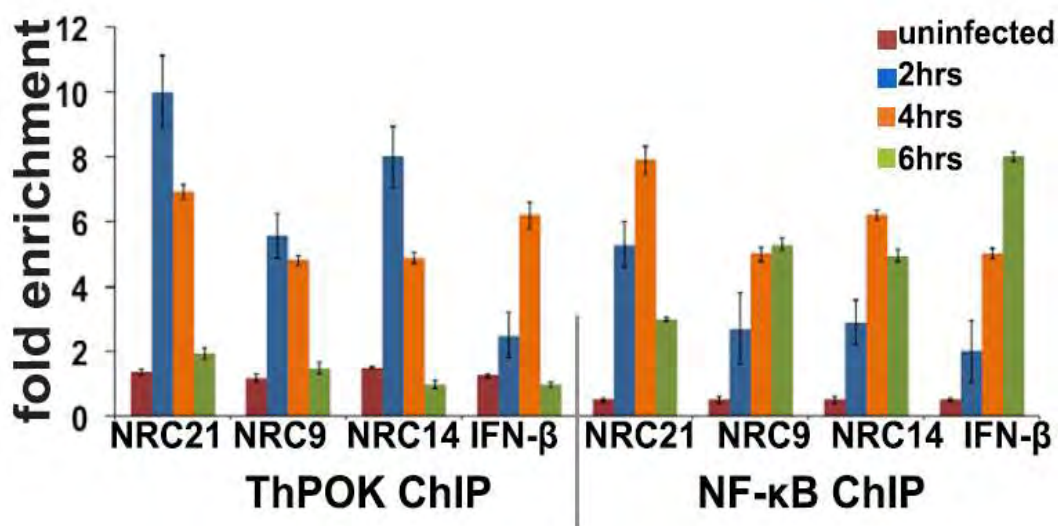
αλληλεπιδρούν με τον ενισχυτή της IFN-β, χρησιμοποιώντας 3D DNA FISH. Επίσης έγινε έλεγχος στην ικανότητα τους να προωθούν την μεταγραφική ενεργοποίηση της IFN-β. Στην Εικόνα 1 (γραμμή 2), βλέπουμε ότι η αλληλουχία 100bp, που περιλαμβάνει το κεντρικό στοιχείο Alu του NRC21 επαρκεί τόσο για την αλληλεπίδραση με τον ενδογενή γονιδιακό τόπο της IFN-β, όσο και για να ενισχύσει την έκφραση της IFN-β. Με τον ίδιο τρόπο, η έλλειψη της αλληλουχίας που βρίσκεται στο 3' άκρο, καθοδικά του NF-κΒ, επιφέρει ο ίδιο αποτέλεσμα (Εικόνα 1, γραμμή 3). Παρόλα αυτά έλλειψη της αλληλουχίας που βρίσκεται στο 5' άκρο του NF-κΒ (Εικόνα 1, γραμμή 4) αποτρέπει τόσο το σχηματισμό διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων, όσο και την ενίσχυση της έκφρασης της IFN-β. Αξίζει να επισημάνουμε πως οι αλληλουχίες που διαγράφηκαν περιέχουν GAGA μοτίβα τα οποία είναι συντηρημένα και στα τρία NRCs (NRC9, NRC14 και NRC21) τόσο σε επίπεδο αλληλουχίας όσο και θέσης. Με σκοπό την αποκάλυψη του ρόλου των GAGA μοτίβων ως προς την ικανότητα του NRC21 να αλληλεπιδρά με το γονίδιο της IFN-β, έγινε απαλοιφή της πιο συντηρημένης GAGA αλληλουχίας που βρίσκεται ανοδικά της θέσης πρόσδεσης του NF-κΒ και κατασκευάστηκαν σταθερές κυτταρικές σειρές HeLa που φέραν είτε τη μεταλλαγμένη NRC21 αλληλουχία, είτε τη WT αλληλουχία. Στην Εικόνα 1 γραμμή 5 βλέπουμε πως η GAGA αλληλουχία είναι απαραίτητη για τις επαγόμενες από ιική μόλυνση διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του NRC21 και του γονιδίου της IFN-β καθώς η μεταλλαγή της μειώνει δραματικά τόσο τη συχνότητα των αλληλεπιδράσεων NRC21-IFN-β, όσο και την έκφραση της IFN-β. Παρομοίως, η θέση πρόσδεσης του NF-κΒ χρειάζεται για τη λειτουργία του NRC21 (Εικόνα 1, γραμμή 6). Τα αποτελέσματά αυτά υποστηρίζουν έντονα την ιδέα πως οι άθικτες GAGA και NF-κΒ αλληλουχίες είναι καθοριστικές για την ικανότητα του NRC21 να αλληλεπιδρά με την περιοχή του γονιδίου της IFN-β και να αυξάνει την ικιά επαγόμενη έκφρασή του.



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση των αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή σταθερών κυτταρικών σειρών και διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων από το πείραμα DNA FISH (μπλε) που απεικονίζει αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενδογενούς IFNB1 και διαμολυσμένου NRC και της έκφρασης της IFNB1 (κόκκινο). Η περιοχή GAGA είναι απαραίτητη για την πραγματοποίηση των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων σε συνεργασία με την περιοχή πρόσδεσης του NF-κΒ.

Ο μεταγραφικός παράγοντας ThPOK έρχεται στο προσκήνιο και δείχνει να προσδένεται σε πολλές θέσεις στα NRCs, αλλά και στην κρίσιμη περιοχή GAGA, κάτι το οποίο αποδεικνύεται με *in vitro* πειράματα DNaseI Footprinting χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένο ThPOK και NF-κΒ. Επίσης μέσω αυτών των πειραμάτων δείχθηκε πως ο ThPOK προσδένεται και στον ενισχυτή της IFN-β. Αυτό όμως που έχει ιδιαίτερη σημασία είναι πως τόσο στον NRC21 όσο και στον ενισχυτή της IFN-β η θέση πρόσδεσης του NF-κΒ αλληλεπικαλύπτεται ή βρίσκεται δίπλα στις θέσεις πρόσδεσης του ThPOK. Επιπλέον, μέσω EMSA πειραμάτων αποδεικνύεται η συνεργατική πρόσδεση NF-κΒ και ThPOK. Χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένο NF-κΒ και ThPOK και την αλληλουχία του NRC21 ή του ενισχυτή της IFN-β, σημασμένη με 32P, δείχθηκε πως με τη προσθήκη μιας μικρής σταθερής ποσότητας ThPOK, σε αυξανόμενες ποσότητες NF-κΒ αυξάνει δραματικά η συγγένεια πρόσδεσης και των δύο πρωτεϊνών στον NRC21. Παρομοίως, η συγγένεια πρόσδεσης στον NRC21 ενός μικρού σταθερού ποσού NF-κΒ αυξάνεται δραματικά από την προσθήκη αυξανόμενων ποσοτήτων ThPOK. Η συνεργατική πρόσδεση στο DNA μεταξύ του NF-κΒ και του ThPOK, απαιτεί να είναι άθικτη τόσο η κΒ όσο και η GAGA περιοχή πρόσδεσης, καθώς μεταλλαγή σε οποιαδήποτε από τις δύο καταργεί τη συνεργατικότητα.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP) χρησιμοποιώντας αντισώματα ειδικά για τον ThPOK, τον p65 (NF-κΒ) και χρωματίνη προερχόμενη από υγιή και μολυσμένα με ιό Sendai για διαφορετικά χρονικά διαστήματα HeLa κύτταρα.



Εικόνα 9: ThPOK ChIP και NF-κB ChIP σε κύτταρα HeLa μη μολυσμένα με ιό και για 2-4-6 ώρες μετά την ιική μόλυνση. Οι τιμές αναφέρονται σε αύξηση πρόσδεσης σε σχέση με ένα control πείραμα IgG και είναι κανονικοποιημένες με τις τιμές από ένα negative locus (GAPDH).

Τόσο ο NF-κΒ όσο και ο ThPOK προσδένονται στα τρία ενδογενή NRCs, με κινητική που προσιδιάζει την κινητική των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων. Ωστόσο, η πρόσδεση του ThPOK αλλά και του NF-κΒ στα NRCs συμβαίνει νωρίτερα από ότι στον ενισχυτή της IFN-β (Εικόνα 2), μία παρατήρηση που συμφωνεί με την

ιδέα πως η δέσμευση του NF-κΒ στα NRCs μεταφέρεται στον ενισχυτή της IFN-β μέσω διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων.

Για να μελετήσουμε το λειτουργικό ρόλο του ThPOK στις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των NRCs και της IFN-β *in vitro*, δημιουργήσαμε στο εργαστήριο σταθερές HeLa και HCT116 κυτταρικές σειρές όπου πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση του ThPOK γονιδίου με λεντικό φορέα shRNA, ειδικό για τον ThPOK χωρίς να επηρεάζονται τα επίπεδα των πρωτεϊνών p65 και H3.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Κυτταροκαλλιέργειες

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη κυτταρική σειρά HeLa και HCT116. Τα HeLa κύτταρα είναι πολυπλοειδή καρκινικά κύτταρα, ενώ τα HCT116 είναι ανθρώπινα διπλοειδή επιθηλιακά κύτταρα. Για την καλλιέργεια τους χρησιμοποιείται πλήρες θρεπτικό υλικό μέσο D₁₀ [DMEM (Dulbecos Modified Eagles Medium) εμπλουτισμένος με 10 % FBS (εμβρυϊκός ορός βοδιού), 1 % PEN-STREP (διάλυμα αντιβιοτικών πενικιλίνης – στρεπτομικίνης)] και 1 % GlutaMAX. Τα κύτταρα διατηρούνται στους 37° C με 5% CO₂, είναι προσκολλητικά και η επανακαλλιέργεια τους γίνεται με χρήση 0,05% θρυψίνης διαλυμένης σε PBS (stock: 0.5% trypsin-EDTA 10x, Gibco, 15400-054). Για την διεξαγωγή των πειραμάτων, πέραν των HeLa και HCT116 κυττάρων φυσιολογικού τύπου, χρησιμοποιήθηκαν HeLa και HCT116 κύτταρα στα οποία είχε πραγματοποιηθεί καταστολή (knockdown, KD) του γονιδίου *ZBTB7B* (shThPOK κύτταρα) με την τεχνολογία των shRNAs. Για να επιτευχθεί αυτό προχωρήσαμε στη δημιουργία λεντι-ιών σε κύτταρα HEK293T (ανθρώπινα κύτταρα εμβρυϊκού νεφρικού επιθηλίου), τα οποία εμφανίζουν μεγάλη δεκτικότητα μετά από διαμόλυνση με πλασμίδια.

Η δημιουργία των λεντι-ιών προϋποθέτει την ύπαρξη τριών πλασμιδίων. Ο κεντρικός φορέας, pLKO.1, περιέχει όλες τις *cis* αλληλουχίες που θα αποτελέσουν το γενετικό υλικό του παραχθέντος λεντι-ιού, καθώς και την αποσιωπητική κασέτα. Κάτω από τον έλεγχο του (RNA Pol III) υποκινητή U6, εκφράζει μόρια shRNA, ικανά επάγουν το μονοπάτι παρεμπόδισης του RNA στον ξενιστή. Τα δυο επιπλέον πλασμίδια, τα pMD2G και psPAX2, κωδικοποιούν τους απαραίτητους *trans* παράγοντες για το πακετάρισμα του ιού (packaging vectors). Ο psPAX2 κωδικοποιεί τις απαραίτητες για το σχηματισμό και λειτουργικότητα του ιού πρωτεΐνες Gag (Ιντεγκράση), Pol (Πολυμεράση) και Rev (Αντίστροφη μεταγραφάση). Ο pMD2G κωδικοποιεί τη γλυκοπρωτεΐνη VSV-G (Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein), μια πρωτεΐνη του ιικού φακέλου, στην οποία οφείλεται και η ικανότητα του ιού να μολύνει την ευρύτατη ποικιλία κυττάρων. Έπειτα έχουμε τον σχεδιασμό των shRNA αλληλουχιών, όπου ξεκινάει με την εύρεση μια siRNA αλληλουχίας ενάντια σε κάποιο συγκεκριμένο mRNA. Αφού τις σχεδιάσουμε στη συνέχεια τις εισάγουμε στους pLKO.1 φορείς. Αφού γίνει η επιλογή των αποικιών με τους επιθυμητούς ανασυνδυασμένους φορείς, στη συνέχεια ακολουθεί η παραγωγή αυτών των ανασυνδυασμένων φορέων σε μεγάλες ποσότητες με τη χρήση του συστήματος *maxi-preparation kit*. Κατά την διαμόλυνση κυττάρων με λεντι-ιούς παίρνουμε στο τέλος της διαδικασίας της διαμόλυνσης τα ιωσωμάτια τα οποία τα χρησιμοποιούμε για να μολύνουμε κύτταρα.

Αφού έχει γίνει συλλογή των ιωσωμάτων και έχει ολοκληρωθεί η τιτλοδότηση των ιών με βάση την μολυσματικότητά τους, ακολουθεί η δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών με τη μόλυνση των κυττάρων με τα ιωσωμάτια και προσθήκη polybrene. Το polybrene (Hexadimethrine bromide) επηρεάζει το φορτίο της

κυτταρικής μεμβράνης αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα μεταγωγής του λεντι-ιού με συνέπεια να προκαλείται γονιδιακή σίγαση (knockdown). Τέλος, ακολουθεί επιλογή των κλώνων που έχουν δεχθεί το πλασμίδιο με χρήση του αντιβιοτικού πουρομυκίνη, καθώς έχει εισαχθεί γονίδιο ανθεκτικότητας σε πουρομυκίνη μαζί με το πλασμίδιο του λεντι-ιού.

Για να μπορέσουμε να ελέγξουμε εάν έχει πραγματοποιηθεί με επιτυχία η γονιδιακή σίγηση στα HeLa αλλά και HCT116 κύτταρα πρέπει να επιβεβαιώσουμε τη μη έκφραση της πρωτεΐνης ThPOK στα κύτταρα αυτά. Με σκοπό τη συλλογή κυττάρων στα οποία θα γίνει έλεγχος της αποσιώπησης του γονιδίου ThPOK, ακολουθούμε την παρακάτω διαδικασία:

1. Καλλιεργούμε παράλληλα κυτταρικές σειρές HeLa και HCT116 φυσιολογικού τύπου και shThPOK. Η καλλιέργειες αυτές των κυττάρων πραγματοποιούνται σε τρυβλία διαμέτρου 10cm, που περιέχουν 10ml θρεπτικού μέσου D₁₀ [DMEM (Dulbecos Modified Eagles Medium) εμπλουτισμένος με 10 % FBS (εμβρυϊκός ορός βοδιού), 1 % PEN-STREP (διάλυμα αντιβιοτικών πενικιλίνης – στρεπτομυκίνης). Τα κύτταρα διατηρούνται στους 37° C με 5% CO₂
2. Όταν η πληρότητα των τρυβλίων είναι 85-95%(την ελέγχουμε στο μικροσκόπιο), προχωράμε στη συλλογή των κυττάρων
3. Τα κύτταρα είναι κολλημένα στον πάτο του τρυβλίου οπότε απομακρύνουμε το προηγούμενο θρεπτικό μέσο DMEM μαζί με τα νεκρά κύτταρα που αιωρούνται
4. Προσθέτουμε σε κάθε τρυβλίο 5 ml διάλυμα PBS ώστε να ξεπλυθεί όσο καλύτερα γίνεται από το θρεπτικό μέσο και στη συνέχεια το αποχύνουμε
5. Προσθέτουμε 3 ml θρυψίνης και το αφήνουμε για επώαση στους 37°C για 5 λεπτά. Με την θρυψίνη επαναιωρούνται τα κύτταρα και έτσι καθίσταται δυνατή η συλλογή τους
6. Μετα το πέρας των 5 λεπτών προσθέτουμε στο τρυβλίο που περιέχει θρυψίνη την διπλάσια ποσότητα θρεπτικού μέσου DMEM (δηλαδή 6 ml), ώστε να ανασταλεί η δράση της θρυψίνης.
7. Μεταφέρουμε αυτά τα συνολικά 9 ml από κάθε τρυβλίο σε ένα falcon των 15 ml
8. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 1200rpm για 5 λεπτά
9. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε κάθε κυτταρική πελέτα που βρίσκεται στο falcon των 15 ml σε 2ml PBS και διαμοιράζουμε σε 2 σωληνάρια τύπου Eppendorf
10. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 1200rpm για 5 λεπτά
11. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και χρησιμοποιούμε άμεσα τις κυτταρικές πελέτες για τη διαδικασία του στυπώματος κατά western με σκοπό τον έλεγχο της αποσιώπησης του γονιδίου ThPOK. Εναλλακτικά, αποθηκεύουμε τις κυτταρικές πελέτες, μέχρι τη χρήση τους, σε καταψυκτική -80°C.

Απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

Για τον έλεγχο της επιτυχούς αποσιώπησης του γονιδίου shThPOK, πραγματοποιούμε απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από τα WT και shThPOK HeLa και HCT116 κύτταρα ως εξής:

- Επαναδιαλύουμε τα κύτταρα που βρίσκονται στα σωληνάρια με 80 μl διάλυμα RIPA (το οποίο επιτρέπει την λύση των κυττάρων και την εκχύλιση όλων των πρωτεϊνών του κυττάρου-WCE)
- Ακολουθεί έντονη ανάδευση ενός λεπτού στο μηχάνημα vortex και έπειτα επώαση για πέντε λεπτά στον πάγο
- Νέα ανάδευση ή πιπετάρισμα για να βοηθήσουμε το διάλυμα RIPA στην λύση των κυττάρων για ένα λεπτό, ενώ έπεται νέα επώαση για 15 λεπτά στον πάγο.
- Φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις 13000 στροφές
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο σωληνάριο
- Προσθέτουμε σε αυτό 10 μl 5X Lamelli buffer (διάλυμα φόρτωσης που περιέχει β-μερκαπτοαιθανόλη)
- Η μερκαπτοαιθανόλη ανάγει τους δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι αναπτύσσονται ανάμεσα σε δύο ομάδες -SH κυστεινών της ίδιας ή δύο διαφορετικών πολυπεπτιδικών αλυσίδων.
- Βράζουμε το δείγμα για 10 λεπτά στους 100°C
- Φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές για 1 λεπτό
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο σωληνάριο

Το υπερκείμενο που βρίσκεται σε νέο σωληνάριο πρέπει να τοποθετηθεί άμεσα στον πάγο και είναι έτοιμο να χρησιμοποιηθεί για την συνέχεια του πειράματος στην ανοσοαποτύπωση κατά western.

Διάλυμα Lamelli	Διάλυμα RIPA
250 mM pH: 6.8 Tris-HCl	50 mM Hepes-KOH, pH 7,5
30% γλυκερόλη	500 mM LiCl
10% SDS	1 mM EDTA
0.02% μπλε της βρωμοφαινόλης	1% NP-40
5% β-μερκαπτοαιθανόλη	0,7% DOC
	1 mM PMSF
	1X Proteinase inhibitors cocktail
	ddH ₂ O

Πίνακας 1: Σύσταση διαλυμάτων που απαιτούνται για την απομόνωση πρωτεϊνών

Ανοσοαποτύπωση κατά western

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης αποτελεί τη δημοφιλέστερη μέθοδο ποσοτικοποίησης και διαχωρισμού των πρωτεϊνών ενός δείγματος. Το πήκτωμα της πολυακρυλαμίδης είναι ένα τρισδιάστατο πλέγμα από μακριές αλειφατικές αλυσίδες πολυακρυλαμίδης που ενώνονται μεταξύ τους με μόρια N-N μεθυλενο-δις-ακρυλαμίδης (MBA). Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης είναι τα καταλληλότερα για ηλεκτροφόρηση γιατί αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις και σχηματίζονται εύκολα. Επίσης το μέγεθος των πόρων μπορεί να ρυθμιστεί με την επιλογή διαφορετικών συγκεντρώσεων ακρυλαμίδης και MBA. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα καθυστερούν. Ο σχηματισμός του πηκτώματος, με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδης και MBA, γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου (RT) με τη βοήθεια δύο πολυμεριστικών παραγόντων: του APS και του TEMED, το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS. Γενικά, όσο πιο μικρή είναι η συγκέντρωση της πολυακρυλαμίδης τόσο μεγαλύτεροι πόροι δημιουργούνται στο πήκτωμα και αντιστρόφως.

Η πιο συχνή μέθοδος ηλεκτροφόρησης είναι αυτή που πραγματοποιείται σε αποδιατακτικές συνθήκες όπου οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος (SDS-PAGE). Το απορρυπαντικό SDS, μετουσιώνει τις πρωτεΐνες και προσδίδει σε αυτές αρνητικό φορτίο. Υπό αυτές τις συνθήκες οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση τη μοριακή τους μάζα με αποτέλεσμα οι μικρότερες πρωτεΐνες να μετακινούνται ταχύτερα προς το θετικό ηλεκτρόδιο και οι μεγαλύτερες πιο αργά.

Η πειραματική διαδικασία του στυπώματος κατά western ξεκινά με την ανάλυση των πρωτεϊνικών δειγμάτων σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης-SDS. Αρχικά ετοιμάζουμε το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης-SDS, το οποίο αποτελείται από δύο ξεχωριστά πηκτώματα. Αυτά είναι:

- Πήκτωμα διαχωρισμού(separating gel) 10% ακρυλαμίδα

Πήκτωμα διαχωρισμού 10 % (5mL)
1,67 mL Acrylamide 30 % ^{w/v} (Sigma, A3574)
2,05 mL ddH ₂ O
1,23 mL 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
25 μL 20 % SDS
20 μL 10 % APS
10 μL TEMED (AppliChem)

Πίνακας 2: Σύσταση πηκτώματος διαχωρισμού

- Πήκτωμα συμπύκνωσης(stackin gel) 4% ακρυλαμίδα, έχει μεγάλο μέγεθος πόρων και συσσωρεύει τις πρωτεΐνες σε μια στενή περιοχή

Πήκτωμα συμπύκνωσης 4 % (2,5 mL)
425 μ L Acrylamide 30 % ^{w/v} (Sigma, A3574)
1,428 mL ddH ₂ O
625 μ L 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
12,5 μ L 20 % SDS
10 μ L 10 % APS
5 μ L TEMED (AppliChem)

Πίνακας 3: Σύσταση πηκτώματος συμπύκνωσης

Τα βήματα που ακολουθούμε για την παρασκευή του πηκτώματος είναι τα εξής:

1. Επιλέγουμε τα τζάμια με το επιθυμητό πάχος (συνήθως 1mm) και τα αντίστοιχα πάχους χτενάκια με τον αριθμό θέσεων που επιθυμούμε. Στη συνέχεια τοποθετούμε τα τζάμια στην αντίστοιχη συσκευή, ώστε να είναι έτοιμα να υποδεχτούν τα διάλυμα του πηκτώματος.
2. Παρασκευάζουμε το πήκτωμα όπου θα διαχωριστούν οι πρωτεΐνες μας προσθέτοντας σε falcon 15 ml τα διαλύματα που βλέπουμε στον πίνακα . Συνήθως πρώτα προσθέτουμε το απιονισμένο νερό, ενώ πάντα στο τέλος προστίθεται τα πολυμεριστικά APS και TEMED.
3. Μετά την προσθήκη των πολυμεριστικών μεταφέρουμε άμεσα το διάλυμα για το πήκτωμα διαχωρισμού στο εσωτερικό των τζαμιών και εν συνεχεία προσθέτουμε 500 μ L ισοπροπανόλη για να ευθυγραμμίσουμε το πήκτωμα και να το απαλλάξουμε από τυχόν φυσαλίδες.
4. Μετά το πέρας 15 λεπτών, το διάλυμα έχει πολυμεριστεί και πήξει. Αφαιρούμε την ισοπροπανόλη και συνεχίζουμε με την παρασκευή του πηκτώματος συμπύκνωσης.
5. Αφού γίνει η παρασκευή του σύμφωνα με τον πίνακα, τότε το προσθέτουμε στα τζάμια που περιέχουν ανάμεσα τους το πήκτωμα διαχωρισμού και αμέσως τοποθετούμε τα χτενάκια πριν αυτό πολυμεριστεί. Αυτό το πήκτωμα διασφαλίζει ότι οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος θα φτάσουν ταυτόχρονα στο κυρίως πήκτωμα διαχωρισμού.

Παρασκευάζουμε το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης σε έναν ογκομετρικό κύλινδρο των 1000 ml. Προσθέτουμε 100 mL 10X EL Buffer, 5 mL 20 % SDS και 895 mL dH₂O. Πριν φορτώσουμε τα δείγματά μας, ξεπλένουμε τις θέσεις υποδοχής των δειγμάτων με τη βοήθεια μιας σύριγγας και στη συνέχεια ηλεκτροφορούμε το πήκτωμα στα 100 V για 15 λεπτά (PRE-RUN), αφού έχουμε φορτώσει 2 μ L 2X διαλύματος φόρτωσης σε κάθε πηγαδάκι(προαιρετικό). Στη συνέχεια, βράζουμε τα δείγματα για 5 λεπτά στους 100°C, τα φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό σε 13000 rpm, τα αποθηκεύουμε σε πάγο και τα φορτώνουμε σε πήκτωμα ακρυλαμίδης χρησιμοποιώντας παράλληλα 5 μ L πρωτεϊνικού μάρτυρα (Page Ruler Prestained Protein Ladder 10 to 250 kDa, 26620) για να μπορούμε να υπολογίσουμε το μέγεθος των πρωτεϊνών. Τέλος, ηλεκτροφορούμε στα 100 V μέχρι να περάσουν

τα δείγματα το πήκτωμα πακεταρίσματος και στη συνέχεια ρυθμίζουμε την τάση στα 120 V όπου γίνεται η ηλεκτροφόρηση κατά μήκος του πηκτώματος Διαχωρισμού.

10x EL (1L)
30.3g Tris base
144g glycine
ddH ₂ O

Πίνακας 4: Σύσταση διαλύματος 10x EL

Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Transfer)

Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση παρασκευάζουμε το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) σε ογκομετρικό κύλινδρο των 1000 mL προσθέτοντας τα εξής:

- 200 mL μεθανόλη
- 100 mL 10X EL Buffer
- 2 mL 20 % SDS
- ddH₂O 698 mL

Σε γυάλινο δοχείο που έχουμε προσθέσει το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς, τοποθετούμε το πήκτωμα πάνω στο οποίο έχει εφαρμοστεί η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ανάμεσα σε τέσσερα διηθητικά χαρτιά Whatman που έχουν εμποτιστεί με το διάλυμα, μέσα στην ειδική θήκη μεταφοράς. Η μεμβράνη κόβεται σε μέγεθος όμοιο με αυτό του πηκτώματος, τοποθετείται εφαπτόμενη στην επιφάνεια του, και εν συνεχεία τοποθετούνται στη συσκευή μεταφοράς με την ακόλουθη διάταξη: αρνητικός πόλος, σφουγγάρι, 2 φύλλα χαρτιού Whatman, πήκτωμα, μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, 2 φύλλα χαρτιού Whatman, σφουγγάρι, θετικός πόλος. Στη συνέχεια, τοποθετούμε τη συσκευή μεταφοράς και την παγοκύστη (για αποφυγή της υπερθέρμανσης) στη συσκευή όπου θα πραγματοποιηθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στην νιτροκυτταρίνη, προσθέτουμε το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς και ρυθμίζουμε την τροφοδοτική συσκευή στα 300 mA, για 1 ώρα.

Δέσμευση μη ειδικών θέσεων για το αντίσωμα (Blocking)

Συνεχίζουμε τη διαδικασία αφού ελέγχουμε ότι η μεταφορά πραγματοποιήθηκε επιτυχώς, σύμφωνα με την εμφάνιση των ζωνών του πρωτεϊνικού μάρτυρα στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Έπειτα, παρασκευάζουμε διάλυμα 5 % ^{w/v} γάλα (AppliChem, Non-fat dried milk powder) / PBST (PBS, 0,1 % Tween 20). Το PBS-T ενισχύει τις ειδικές αλληλεπιδράσεις αντιγόνου-αντισώματος, ενώ οι πρωτεΐνες του γάλακτος δεσμεύουν τις μη ειδικές θέσεις στις οποίες μπορεί να δεσμευθεί το αντίσωμα. Τοποθετούμε τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης στο διάλυμα και επωάζουμε για 45 λεπτά σε RT υπό ήπια ανάδευση.

Προσθήκη 1^{ου} αντισώματος

Παρασκευάζουμε διάλυμα 1 % ^{w/v} γάλα/PBS-T και προσθέτουμε σε αυτό το πρωτογενές αντίσωμα που είναι ειδικό για την κάθε πρωτεΐνη που μελετάμε (a-ThPOK: LSBio, LS-C290361: αραιώση 1:2.000, a-p65: Abcam, ab7970: αραιώση 1:1.000, a-GAPDH, AMBION, AM4300 : αραιώση 1:5.000, a-H3: Abcam, ab1791: αραιώση 1:5.000). Τα αντισώματα a-GAPDH και a-H3 χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες για το αν τα δείγματα είναι ισοφορτωμένα μεταξύ τους. Έπειτα, κόβουμε τη μεμβράνη στις περιοχές που περιμένουμε να βρίσκονται οι πρωτεΐνες που μελετάμε και επωάζουμε τη κάθε μεμβράνη με το αντίστοιχο αντίσωμά της υπό ανάδευση, στους 4°C για 16 ώρες.

Προσθήκη 2^{ου} αντισώματος

Την επόμενη μέρα (μετά το πέρας των 16 ωρών) απομακρύνουμε το πρωτογενές αντίσωμα και το αποθηκεύουμε στους -20 για επόμενη χρήση. Πριν την προσθήκη του 2^{ου} αντισώματος είναι απαραίτητες οι πλύσεις κάθε μεμβράνης υπό ανάδευση σε RT, με ποσότητα PBS-T ικανή για να καλυφθεί το κομμάτι της νιτροκυτταρίνης. Η συνολική διάρκεια των πλύσεων είναι 30 λεπτά και πραγματοποιούνται ως εξής: 1πλύση για 15 λεπτά ακολουθούμενη από 3 πλύσεις διάρκειας 5 λεπτών. Στη συνέχεια, παρασκευάζουμε 1 % ^{w/v} γάλα/PBST στο οποίο προσθέτουμε το δευτερογενές αντίσωμα με αραιώση 1:10000 goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, SC-2030) στα κομμάτια της νιτροκυτταρίνης που έχουμε επωάσει όλα τα πρωτογενή αντισώματα εκτός του a-GAPDH όπου προσθέτουμε το δευτερογενές IgG-HRP goat anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology, SC-2055) 1:10000. Το δευτερογενές αντίσωμα προέρχεται από διαφορετικό οργανισμό από αυτόν από τον οποίο έχουμε απομονώσει τις πρωτεΐνες, είναι ειδικό για τη βαριά αλυσίδα του πρώτου αντισώματος και είναι συνδεδεμένο ομοιοπολικά με το ένζυμο υπεροξειδάση (HRP). Επωάζουμε τις μεμβράνες με το δευτερογενές αντίσωμα σε RT για 1 ώρα υπό ανάδευση.

Διαδικασία εμφάνισης σε φιλμ

Μετά το πέρας της επωασής η μεμβράνη ξεπλένεται ξανά για συνολικό χρόνο 30 λεπτά όπως και μετά από το πρωτογενές αντίσωμα αλλά με τη διαφορά ότι η τελευταία πλύση των 5 λεπτών γίνεται με PBS αντί για PBS-T. Αφού ολοκληρωθούν οι πλύσεις προσθέτουμε, ανάλογα με το μέγεθος του κομματιού της μεμβράνης, από 400-1000 μl από το μείγμα φθορισμού ECL (H₂O₂ και Luminol) και αφήνουμε 2-3 λεπτά το κομμάτι της μεμβράνης που έχει επωαστεί με το a-p65 αντίσωμα, 10 λεπτά αντίστοιχα με το a-ThPOK και 1 λεπτό τη μεμβράνη με το a-H3 και a-GAPDH. Το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης (HRP) είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η λουμινόλη (Luminol) είναι ο δότης ηλεκτρονίων και οξειδώνεται. Η διεγερμένη λουμινόλη μεταπίπτει σε σταθερή κατάσταση μετά την εκπομπή φωτονίων. Το μίγμα αυτό λειτουργεί ως υπόστρωμα για το HRP ένζυμο με αποτέλεσμα να παράγει φως στις περιοχές όπου υπάρχει ο συνδυασμός 1^{ου} αντισώματος-2^{ου} αντισώματος (+HRP) και ECL. Φτάνοντας προς το τέλος της διαδικασίας απομακρύνουμε την περίσσεια του ECL και καλύπτουμε τη νιτροκυτταρίνη με διαφανή μεμβράνη αφού την έχουμε μεταφέρει στην κασετίνα εμφάνισης. Ολοκληρώνουμε τη διαδικασία στο δωμάτιο εμφάνισης όπου

καλύπτουμε τη νιτροκυτταρίνη με το φιλμ εμφάνισης για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, το οποίο στη συνέχεια το τοποθετούμε στο μηχάνημα εμφάνισης.

Απομόνωση RNA

Για να αποδείξουμε ότι έχει γίνει με επιτυχία η αποσιώπηση του γονιδίου του ThPOK στις shThPOK HeLa και HCT116 κυτταρικές σειρές πρέπει να δείξουμε ότι μετά από ιική μόλυνση έχουμε μειωμένη έκφραση της IFN- β σε σχέση με τα WT, ενώ δεν επηρεάζεται η έκφραση της IL-8, παρόλο που επάγεται και αυτή από ιική μόλυνση, καθώς δεν υπάρχουν διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις και άρα δεν συμβάλλει ο ThPOK στην πρόσδεση του NF- κ B στον ενισχυτή του γονιδίου της. Το πρώτο στάδιο για να το δείξουμε αυτό είναι η απομόνωση του RNA.

Οι μεθοδολογίες απομόνωσης RNA περιλαμβάνουν τρία βασικά βήματα με πρώτο την αδρανοποίηση ενδογενών ριβονουκλεασών (RNase) οι οποίες δρουν καταστρέφοντας το RNA τόσο στα υλικά όσο και τα αντιδραστήρια εάν αυτά δεν είναι κατεργασμένα ειδικά για να είναι ελεύθερα από RNάσες όσο και στο ίδιο το παρασκεύασμα αφού ελευθερώνονται από τα οργανίδια των κυττάρων που λύνονται. Δεύτερο βήμα είναι η απόσπαση του RNA από τις πρωτεΐνες στις οποίες είναι προσδεμένο. Τρίτο βήμα είναι ο φυσικός διαχωρισμός του από άλλα μόρια του διαλύματος.

Το πρωτόκολλο απομόνωσης RNA που ακολουθήσαμε είναι το NucleoZOL της Macherey – Nagel και η διαδικασία που ακολουθήσαμε ήταν η εξής:

- Συλλέγουμε τα κύτταρα με 1XPBS, αφού τα ξεπλύνουμε πρώτα 2 φορές με 1XPBS
- Φυγοκεντρούμε σε 3000 rpm
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 500 μ L NucleoZOL/ 5×10^6 κύτταρα προκαλώντας λύση των κυττάρων και επαναδιαλύουμε μέχρι πλήρους ομογενοποίησης
- Για κάθε 500 μ L NucleoZOL προσθέτουμε 200 μ L RNase-free Water. Αναμιγνύουμε τα δείγματα για 15 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- Φυγοκεντρούμε τα δείγματα σε 11.200 rpm (12.000 g) για 15 λεπτά σε RT.
- Μεταφέρουμε 500 μ L υπερκείμενο σε ένα νέο σωληνάριο. Είναι απαραίτητο να αφήσουμε μια μικρή ποσότητα υπερκειμένου για να αποφύγουμε να πάρουμε ποσότητα ιζήματος.
- Προσθέτουμε 500 μ L ισοπροπανόλης για κάθε 500 μ L υπερκειμένου ώστε να καθιζάνει το RNA. Επωάζουμε τα δείγματα σε RT για 10 λεπτά
- Φυγοκεντρούμε τα δείγματα για 10 λεπτά σε 11.200 rpm
- Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 500 μ L 75 % αιθανόλη.
- Φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά σε 9.100 rpm
- Αφαιρούμε την αιθανόλη. Επαναδιαλύουμε την πελέτα του RNA με 30 μ L νερού απαλλαγμένου από νουκλεάσες. και κάνουμε Vortex τα δείγματα για 3 λεπτά σε RT για αποτελεσματική διαλυτοποίηση
- Υπολογίζουμε τη συγκέντρωση των δειγμάτων μέσω του φασματοφωτόμετρου μικρού όγκου (Nanodrop, Thermo Scientific).

Ακολουθεί η επώαση των δειγμάτων με το ένζυμο DNase ώστε να αποικοδομήσουμε τα υπολείμματα-προσμίξεις DNA που υπάρχουν στα δείγματά μας.

- Βάσει της συγκέντρωσης του κάθε δείγματος, μεταφέρουμε 5μg RNA σε νέο σωληνάριο. Σε κάθε δείγμα προσθέτουμε 2 μL DNase, 1 μL Hae III, 6 μL DNase Buffer 10X και συμπληρώνουμε με νερό απαλλαγμένο από νουκλεάσες έως ότου ο όγκος της κάθε αντίδρασης να φτάσει τα 60 μl.
- Επωάζουμε τα δείγματα για 1 ώρα στους 37°C
- Ακολουθεί καθαρισμός με Φαινόλη – Χλωροφόρμιο. Στα 60 μL αντίδρασης προσθέτουμε 440 μL RNase-free Water και 500 μL Φαινόλη – Χλωροφόρμιο.
- Φυγοκεντρούμε σε 13000 rpm για 5 λεπτά. Μεταφέρουμε την άνω υδατική φάση σε νέο σωληνάριο και προσθέτουμε 500μl χλωροφόρμιο
- Φυγοκεντρούμε σε 13000 rpm για 5 λεπτά. Μεταφέρουμε την άνω υδατική φάση σε νέο σωληνάριο και προσθέτουμε 1:10V CH₃COONa pH 5,2 και διπλάσιο όγκο 100% αιθανόλης.
- Αποθηκεύουμε τα δείγματα στους -80°C για 1 ώρα
- Φυγοκεντρούμε σε 13000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C
- Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε με 70% αιθανόλη
- Φυγοκεντρούμε σε 13000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C, αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε την πελέτα σε 20 μL H₂O απαλλαγμένο από νουκλεάσες.
- Υπολογίζουμε τη συγκέντρωση των δειγμάτων μέσω του φασματοφωτόμετρου μικρού όγκου (Nanodrop, Thermo Scientific

PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR)

Στη συνέχεια το RNA που απομονώσαμε μετατρέπεται σε cDNA μέσω RT-PCR. Ο συνδυασμός της αντίστροφης μεταγραφής με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης επιτρέπει τη σύνθεση αντιγράφων cDNA. Το πρώτο βήμα είναι η ενζυμική μετατροπή του RNA σε cDNA με την αντίστροφη μεταγραφάση, ενώ ακολουθεί ενίσχυση του DNA με Taq πολυμεράση με τον ίδιο τρόπο όπως σε μία κανονική PCR. Με αυτόν τον τρόπο έχουμε τη δυνατότητα ενίσχυσης του ενδογενούς mRNA το οποίο μέσω της αντίστροφης αντιγραφής θα το έχουμε με τη μορφή cDNA. Για την πραγματοποίηση της RT – PCR χρειάζεται να παρασκευάσουμε δύο μίγματα, τα οποία θα περιέχουν τα εξής:

Μίγμα 1 ^{ης} αντίδρασης	Μίγμα 2 ^{ης} αντίδρασης
Εκκινητής oligodT (0,5 μg/μL) 1μL	Buffer 5x για την αντίστροφη μεταγραφάση 4 μL
dNTPs (10 mM) 1 μL	DTT (0,1 M) 2 μL
Υπόστρωμα από το RNA 1 μg	Αντίστροφη μεταγραφάση (Invitrogen, 200 Units) 1 μL
ddH ₂ O μέχρι τα 12 μL	ddH ₂ O μέχρι τα 20 μL*

* υπολογίζουμε και την ποσότητα από το πρώτο μίγμα!

Πίνακας 5: Μίγματα αντιδράσεων 1 και 2 για την εκτέλεση της RT – PCR.

Αρχικά προσθέτουμε το υπόστρωμα σε κάθε PCR tube. Στη συνέχεια προσθέτουμε το μίγμα 1 σε κάθε αντίδραση, τα τοποθετούμε στη συσκευή PCR και επωάζουμε για 5 λεπτά στους 65°C. Κατά τη διάρκεια του δεύτερου βήματος προσθέτουμε το ένζυμο στο μίγμα 2 και στη συνέχεια το διαμοιράζουμε στις αντιδράσεις που βρίσκονται ήδη στη συσκευή.

Για να δούμε εάν τα αποτελέσματα της RT-PCR είναι αληθινά χρησιμοποιούμε για εσωτερικό θετικό έλεγχο ένα γονίδιο που εκφράζεται ανέκαθεν στα κύτταρα που χρησιμοποιούμε, το GAPDH. Εάν δεν ενισχυθεί το cDNA από αυτό το γονίδιο τότε η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής δεν έχει πραγματοποιηθεί σωστά.

Θερμοκρασία	Χρόνος
65° C	5 λεπτά
4° C	5 λεπτά
42° C	52 λεπτά
70° C	15 λεπτά
4° C	Επ' αόριστον

Πίνακας 6: Πρωτόκολλο διεξαγωγής της Αντίστροφης μεταγραφής (RT – PCR)

PCR πραγματικού χρόνου (REAL TIME-PCR)

Η PCR πραγματικού χρόνου αποτελεί την καλύτερη στρατηγική για τη γρήγορη και ακριβή ποσοτικοποίηση RNA και DNA, καθώς επιτρέπει τη μέτρηση της ποσότητας των προϊόντων, και κατ' επέκταση την παρακολούθηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού ενός μορίου-στόχου, σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης της PCR. Ύστερα από μία αρχική φάση κατά την οποία δεν είναι ανιχνεύσιμο το προϊόν της PCR λόγω του ότι βρίσκεται σε πολύ χαμηλή ποσότητα, ακολουθεί μια εκθετική φάση κατά την οποία η ποσότητα σχεδόν διπλασιάζεται σε κάθε βήμα. Αν υπάρχουν περισσότερα μόρια στην αρχή, θα χρειαστούν λιγότεροι κύκλοι για να αρχίσει η εκθετική φάση. Συγκρίνοντας τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για την έλευση της εκθετικής φάσης σε διαφορετικές αντιδράσεις, μπορούμε να προσδιορίσουμε την αρχική ποσότητα των μορίων που χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα στις αντιδράσεις. Τα προϊόντα της PCR ανιχνεύονται με τη βοήθεια της χρωστικής SYBR Green, μίας χρωστικής η οποία προσδένεται στο DNA χωρίς προτίμηση για συγκεκριμένες αλληλουχίες και εκπέμπει φθορισμό μόνο όταν παρεμβάλλεται στη διπλή έλικα. Κάθε φορά πραγματοποιούμε και μία αντίδραση με εκκινητές ειδικούς για ένα γονίδιο που εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα που μελετάμε, όπως είναι η GAPDH, έτσι ώστε να κάνουμε την κανονικοποίηση μεταξύ των δειγμάτων. Με αυτόν τον τρόπο τα αποτελέσματα μας θα μπορούν να είναι συγκρίσιμα. Για κάθε γονίδιο του οποίου την έκφραση θέλουμε να εξετάσουμε παρασκευάζουμε ένα μίγμα που είναι απαραίτητο για την πραγματοποίηση της PCR, επιλέγουμε τους κατάλληλους εκκινητές και ρυθμίζουμε την κατάλληλη θερμοκρασία που απαιτείται για την πρόσδεση των εκκινητών στο γονίδιο-στόχος.

Αφού πραγματοποιήσουμε Real time-PCR για το γονίδιο αναφοράς GAPDH και επιβεβαιώσουμε την επιτυχία της RT-PCR, προχωράμε στην ενίσχυση του cDNA μέσω PCR πραγματικού χρόνου με εκκινητές για τα γονίδια της IFN-β και IL-8.

IFNb, 60° C	Fw: CCTGAAGGCCAAGGAGTACA Rv: AAGCAATTGTCCAGTCCCAG
GAPDH, 60° C	Fw: GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA Rv: TTGAGGTCAATGAAGGGGTC
IL-8, 66° C	Fw: GCAGCTCTGTGTGAAGGTGCAGT Rv: TGTGTTGGCGCAGTGTGGTCC

Πίνακας 7 : Συγκεντρωτικός πίνακας με τις αλληλουχίες και τις θερμοκρασίες πρόσδεσης των εκκινητών κάθε γονιδίου που μελετήσαμε μετά από RT-PCR

Συνεργατική ανοσοκατακρήμνιση (Co-IP)

Η μέθοδος της συνεργατικής ανοσοκατακρήμνισης χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό του συνόλου των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη που ανοσοκατακρημνίζουμε. Γίνεται χρήση του αντισώματος, το οποίο προσδένεται στην πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει επωάζοντάς το με πρωτεϊνικό εκχύλισμα κυττάρων. Το σύμπλοκο αντίσωμα-αντιγόνο (πρωτεΐνη) απομακρύνεται από το δείγμα με τη βοήθεια μαγνητικών σφαιριδίων. Στη συνέχεια μπορούμε με την διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης κατά western να μελετήσουμε τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη που δεσμεύσαμε με το αντίσωμα στην ανοσοκατακρήμνιση ως προς την αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες. Η πειραματική διαδικασία είναι η παρακάτω:

1. Αρχικά μεγαλώνουμε κύτταρα HeLa ή HCT116 WT σε τρυβλία 10cm. Χρειαζόμαστε 8 τρυβλία συνολικά, στα 4 προσθέτουμε ιό Sendai(1ml σε κάθε τρυβλίο) και επωάζουμε για 4 ώρες στους 37°C.
2. Κατά τη διάρκεια επώασης των κυττάρων με τον ιό, αναμιγνύουμε τα μαγνητικά σφαιρίδια(35μL) με το αντίσωμα. Τα αντισώματα που χρησιμοποιούμε είναι το α-ThPOK(LsBio 1γ/λ) και IgG(1γ/λ, παρασκευάστηκε στο εργαστήριο). Αρχικά διαμοιράζουμε σε 2 tubes τα μαγνητικά σφαιρίδια τα οποία ξεπλύθηκαν με διάλυμα λύσης χωρίς αναστολείς πρωτεασών και βενζονάση. Στη συνέχεια με τη βοήθεια της μαγνητικής βάσης απομακρύνουμε το διάλυμα λύσης και επαναδιαλύουμε σε νέο διάλυμα λύσης τα μαγνητικά σφαιρίδια, τα διαμοιράζουμε σε 2 νέα tube και εκεί προσθέτουμε σε κάθε tube ένα αντίσωμα
3. Ακολουθεί επώαση για 4 ώρες στους 4°C υπό ανάδευση
4. Μετά το πέρας 4 ωρών που απαιτούνται για την ικκή μόλυνση των κυττάρων, συλλέγουμε τα κύτταρα από τα τρυβλία. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο, πλένουμε 2 φορές με 10ml 1XPBS και αφού προσθέσουμε επιπλέον 20ml 1XPBS συλλέγουμε τα κύτταρα σε 50ml falcon. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε

- 3000 rpm, απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε την κάθε κυτταρική πελέτα σε 1ml πλήρους διαλύματος κυτταρικής λύσης.
5. Επωάζουμε για 30 λεπτά υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
 6. Αφού πραγματοποιηθεί η λύση των κυττάρων, φυγοκεντρούμε τα σωληνάρια σε 13000 rpm για 2 λεπτά και μεταφέρουμε το 1ml υπερκειμένου (περιέχει τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων) σε νέο σωληνάριο. Ακολουθεί επώαση με 35μL μαγνητικών σφαιριδίων για 1,5 ώρα υπό ανάδευση στους 4 °C. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται για τη δέσμευση μη ειδικών πρωτεϊνών με τα μαγνητικά σφαιρίδια, έτσι ώστε κατά τη μετέπειτα επώαση των μαγνητικών σφαιριδίων που φέρουν το αντίσωμα να είναι μειωμένο το ποσοστό των μη ειδικών ως προς τις ειδικές δεσμεύσεις αντισώματος-πρωτεΐνης στόχου.
 7. Μετά την ολοκλήρωση του καθαρισμού των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από τις μη ειδικές δεσμεύσεις με τα μαγνητικά σφαιρίδια (βήμα 6), με τη βοήθεια μαγνητικής βάσης, μεταφέρουμε το 1ml υπερκειμένου σε νέα σωληνάρια. Ακολούθως, διαμοιράζουμε αυτή την ποσότητα σε 2 νέα σωληνάρια και παράλληλα μεταφέρουμε 5μL (1% Input) σε άλλο σωληνάριο.
 8. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης των μαγνητικών σφαιριδίων με τα αντισώματα (βήμα 3), με τη βοήθεια μιας μαγνητικής βάσης, απομακρύνουμε το υπερκείμενο και πραγματοποιούμε 2 πλύσεις με διάλυμα λύσης χωρίς αναστολείς πρωτεασών και βενζονάση. Κατά τη δεύτερη πλύση και πριν τοποθετήσουμε τα σωληνάρια στη μαγνητική βάση, τα διαμοιράζουμε σε 2 νέα σωληνάρια το κάθε ένα. Ακολούθως, τα μεταφέρουμε στη μαγνητική βάση, αφαιρούμε το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε με τα καθαρισμένα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που έχουμε απομονώσει στο βήμα 7. Άρα έχουμε 6 σωληνάρια: IP a-ThPOK 0h, IP a-ThPOK 4h, IP IgG 0h, IP IgG 4h, 1% Input 0h και 1% Input 4h. Τα 2 Input δείγματα τα αποθηκεύουμε στον πάγο ενώ τα 4 IP τα επωάζουμε για 30 λεπτά στους 4°C υπό ανάδευση
 9. Αφού πραγματοποιηθεί το παραπάνω βήμα, με τη βοήθεια μαγνητικής βάσης πραγματοποιούμε 5 πλύσεις, 3 με διάλυμα πλύσης A και 2 με διάλυμα πλύσης B
 10. Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου κατά την πλύση με το διάλυμα B, επαναδιαλύουμε τα μαγνητικά σφαιρίδια κάθε δείγματος σε 30μL διαλύματος φόρτωσης (Lamelli buffer) ενώ παράλληλα προσθέτουμε 25μL ίδιου διαλύματος στα σωληνάρια των Inputs.
 11. Βράζουμε τα δείγματα στους 95°C για 5 λεπτά
 12. Φυγοκεντρούμε σε 13000 rpm για 1 λεπτό
 13. Τοποθετούμε τα σωληνάρια στην μαγνητική βάση και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα σωληνάρια. Τα δείγματα αυτά είναι έτοιμα για να φορτωθούν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης για το πείραμα της ανοσοαποτύπωσης κατά western

Διάλυμα λύσης	Διάλυμα πλύσης A	Διάλυμα πλύσης B	Διάλυμα φόρτωσης 5X
150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl	10% SDS
50 mM Tris/HCl pH7,5	50 mM Tris/HCl pH7,5	50 mM Tris/HCl pH7,5	30% γλυκερόλη
5 % γλυκερόλη	5 % γλυκερόλη	5 % γλυκερόλη	250 mM Tris/HCl pH6,8
1 % NP40	0,05 % NP40	1 mM PMSF	5 %β-μερκαπτεθανόλη
1 mM MgCl ₂	1 mM PMSF		0,02% μπλε βρωμοφαινόλης
1 mM PMSF			
250 U βενζονάση			
1X PIC			

Πίνακας 8: Συγκεντρωτικός πίνακας με τη σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήσαμε στο πείραμα της συνεργατικής ανοσοκατακρήμνιση

Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP)

Τα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης μας δίνουν την δυνατότητα να εξετάσουμε σε ζωντανά κύτταρα (in vivo), σε ποιο βαθμό ένα cis-ρυθμιστικό στοιχείο του DNA καταλαμβάνεται από τη ρυθμιστική πρωτεΐνη που το αναγνωρίζει. Στόχος μας είναι, μέσω αυτής της πειραματικής μεθόδου, να επιβεβαιώσουμε το ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα ThPOK στην επαγωγή των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων των NRCs με τον ενισχυτή του γονιδίου της IFN-β, μετά από ιική μόλυνση, καθώς και τη συνεργατική του πρόσδεση με το NF-κB μεταγραφικό παράγοντα σε αυτούς τους γενετικούς τόπους. Για την πραγματοποίηση του πειράματος χρειαζόμαστε κύτταρα HeLa και HCT116 WT και shThPOK.

Η ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης ξεκινάει με επεξεργασία των κυττάρων με χαμηλή συγκέντρωση φορμαλδεΰδης (1% v/v), η οποία προκαλεί τη διασύνδεση των πρωτεϊνών τόσο μεταξύ τους όσο και με το DNA. Μετά τη διασύνδεση ακολουθεί κατάτμηση της χρωματίνης, ώστε να προκύψουν τμήματα DNA μήκους 200 – 300 bp. Στη συνέχεια προστίθεται αντίσωμα που αναγνωρίζει την πρωτεΐνη που θέλουμε να μελετήσουμε, ενώ η χρήση των μαγνητικών σφαιριδίων καθιστά δυνατή την απομόνωση των συμπλόκων αντισώματος – πρωτεΐνης – χρωματίνης από τα άλλα τμήματα χρωματίνης (που παραμένουν στο υπερκείμενο). Το DNA που ανακτάται μπορεί να αναλυθεί με PCR πραγματικού χρόνου, με αλληλούχιση ή με υβριδοποίηση με μικροσυστοιχίες.

Διασύνδεση πρωτεϊνών (Crosslinking)

1. Για κάθε συνθήκη που θέλουμε να μελετήσουμε, χρειαζόμαστε 3 τρυβλία 15cm σε βαθμό κορεσμού 90%. Από αυτά τα τρυβλία, 1 διαμολύνεται με 2ml ιού Sendai για 2 ώρες, 1 διαμολύνεται για 4 ώρες και 1 θα αποτελέσει το πιάτο ελέγχου όπου δεν πραγματοποιούμε διαμόλυνση με ιό. Η επώαση των

κυττάρων κατά την ιική μόλυνση γίνεται σε θερμοκρασία 37°C. Για να εξασφαλίσουμε πως η διασύνδεση θα γίνει στην ίδια συγκέντρωση φορμαλδεΐδης, πρέπει όλα τα τρυβλία κυττάρων που θα χρησιμοποιήσουμε να βρίσκονται σε συνολικό όγκο (θεραπευτικό υλικό + ιός Sendai) στα 20ml. Επομένως, μετά το πέρας της ιικής μόλυνσης, σε όσα τρυβλία προσθέσαμε ιό, αφαιρούμε 2ml.

2. Εν συνεχεία, προσθέτουμε σε κάθε τρυβλίο 567μL φορμαλδεΐδης 36% v/v (τελική συγκέντρωση 1% v/v) και επωάζουμε για 30 λεπτά στους 4°C υπό ανάδευση εάν η ανοσοκατακρήμνιση γίνει με αντίσωμα για την πρωτεΐνη ThPOK, ενώ για ανοσοκατακρήμνιση με τον NF-κB επωάζουμε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
3. Προσθέτουμε 1 mL 2,5 M γλυκίνη σε κάθε τρυβλίο (τελική συγκέντρωση 0,125 M) για να διακόψουμε τη διαδικασία της διασύνδεσης.
4. Επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου (RT) υπό ανάδευση για 5 λεπτά.
5. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο των τρυβλίων και πλένουμε 2 φορές και πλένουμε 2 φορές με 1XPBS.
6. Επαναιωρούμε τα κύτταρα σε 10ml 1XPBS και τα μεταφέρουμε σε 50ml falcon (προσέχουμε έτσι ώστε σε κάθε falcon να βρίσκονται κύτταρα ίδιου τύπου και αντίστοιχου χρονικού διαστήματος ιικής μόλυνσης).
7. Προσθέτουμε στα τρυβλία 5ml 1XPBS, έτσι ώστε να συλλέξουμε και τα εναπομείναντα κύτταρα και να τα μεταφέρουμε στο ίδιο falcon από το προηγούμενο βήμα.
8. Φυγοκεντρούμε σε 4000 στροφές(rpm) για 5 λεπτά στους 4°C
9. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, επαναδιαλύουμε την κυτταρική πελέτα σε 1XPBS και τη μεταφέρουμε σε σωληνάρια . Κάθε σωληνάριο περιέχει κύτταρα ενός 90% κορεσμένου 15cm τρυβλίου δηλαδή 18-20 εκατομμύρια κύτταρα.
10. Φυγοκεντρούμε σε 4000 στροφές(rpm) για 5 λεπτά στους 4°C. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και συνεχίζουμε άμεσα με τη διαδικασία της κατάτμησης χρωματίνης. Εναλλακτικά, αποθηκεύουμε την κυτταρική πελέτα στους -80°C.

Προετοιμασία της χρωματίνης για κατάτμηση

11. Επαναδιαλύουμε την κυτταρική πελέτα με διάλυμα λύσης (lysis buffer) 1ml/1 τρυβλίο 15cm.
12. Επωάζουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και 10 λεπτά στον πάγο, ενώ κάθε 2 λεπτά ανακινούμε τα σωληνάρια που περιέχουν την χρωματίνη με το διάλυμα λύσης. Από αυτό το σημείο του πρωτοκόλλου, και για όλα τα επόμενα βήματα, τα σωληνάρια με την χρωματίνη πρέπει να βρίσκονται στον πάγο.
13. Φυγοκεντρούμε σε 3000 rpm για 5 λεπτά

14. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και πλένουμε κάθε κυτταρική πελέτα με διάλυμα πλύσης (wash buffer) 1ml/1 τρυβλίο 15cm.
15. Φυγοκεντρούμε σε 3000 rpm για 5 λεπτά
16. Απομακρύνουμε εκ νέου το υπερκείμενο και επαναδιαλύουμε τα κύτταρα μας που έχουν λυθεί σε ένα βαθμό με διάλυμα κατάτμησης (sonication buffer) 1ml/1 τρυβλίο 15cm.
17. Επωάζουμε για 2 ώρες υπό ανάδευση στους 4°C. Αυτό το βήμα βοηθάει στην καλύτερη λύση των πυρήνων, ώστε στο επόμενο βήμα όπου θα γίνει κατάτμηση της χρωματίνης, η ενέργεια που θα δοθεί από τη συσκευή υπερήχων, να αξιοποιηθεί για την κατάτμηση της χρωματίνης και όχι για την λύση των πυρήνων των κυττάρων.

Κατάτμηση της χρωματίνης με τη βοήθεια υπερήχων (sonication)

18. Η κατάτμηση πραγματοποιήθηκε με το Covaris M220 sonicator σύμφωνα με τις εξής ρυθμίσεις στο μηχάνημα: peak power 75, duty factor 25.4, cycles/burst 200, avg power 19.1. Μεταφέρουμε το περιεχόμενο των σωληναρίων σε ειδικά δοχεία της συσκευής covaris για την κατάτμηση της χρωματίνης. Ο ιδανικός χρόνος κατάτμησης για τα κύτταρα HeLa ήταν 14 λεπτά, ενώ για τα HCT116 10 λεπτά.
19. Μετά το τέλος κάθε κατάτμησης με υπερήχους, μεταφέρουμε το περιεχόμενο των δοχείων κατάτμησης, σε νέα σωληνάρια.
20. Φυγοκεντρούμε σε 13000 rpm για 2 λεπτά στους 4° C. Το ίζημα που δημιουργείται στον πυθμένα των σωληναρίων αποτελείται από κύτταρα στα οποία δεν έχει πραγματοποιηθεί επαρκώς η λύση, κυτταρικά θραύσματα καθώς και χρωματίνη που δεν έχει υποστεί κατάτμηση.
21. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα σωληνάρια και απομονώνουμε 20μL από κάθε χρωματίνη για ανάλυση της αποτελεσματικότητας της κατάτμησης (δείγματα ελέγχου κατάτμησης).. Η υπόλοιπη ποσότητα αποθηκεύεται στους -80° C.

Έλεγχος κατάτμησης DNA

22. Πριν προχωρήσουμε στη διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης, πρέπει να ελέγξουμε το πρότυπο κατάτμησης της χρωματίνης. Για το σκοπό αυτό, σε κάθε σωληνάριο δείγματος ελέγχου κατάτμησης, προσθέτουμε 1μL RNaseA και επωάζουμε στους 37 °C για 30 λεπτά.
23. Έπειτα, προσθέτουμε 4L Proteinase K 10mg/ml και 4μL SDS 20%
24. Ανακινούμε καλά σε vortex και προσθέτουμε και 6μL NaCl 5M
25. Επωάζουμε για 16 ώρες στους 65 ° C
26. Προσθέτουμε σε όλα τα δείγματα διάλυμα TE μέχρι τα 200μL
27. Προσθέτουμε 200μL διαλύματος φαινόλης-χλωροφορμίου

28. Φυγοκεντρούμε 13000 rpm και μεταφέρουμε την άνω υδατική φάση σε νέο σωληνάριο.
29. Προσθέτουμε 200μL χλωροφορμίου
30. Φυγοκεντρούμε 13000 rpm και μεταφέρουμε την άνω υδατική φάση σε νέο σωληνάριο.
31. Σε κάθε σωληνάριο προσθέτουμε:
 - 1,5 μL γλυκογόνο(20μg/ μL)
 - 20 μL (1/10 του όγκου) CH₃COONa 3M pH 5,2
 - 400 μL (2 φορές τον όγκο) παγωμένη αιθανόλη 100%
32. Ανακινούμε ελαφρώς και επωάζουμε για 30 λεπτά στους -80 ° C
33. Φυγοκεντρούμε σε 13000 rpm για 45 λεπτά στους 4 ° C
34. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και πλένουμε με 300μL αιθανόλη 70%
35. Φυγοκεντρούμε σε 13000 rpm για 5 λεπτά στους 4 ° C
36. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και αφήνουμε την κυτταρική πελέτα να στεγνώσει πλήρως
37. Επαναδιαλύουμε κάθε πελέτα με 20μL απιονισμένο H₂O, δηλαδή όση ποσότητα χρωματίνης πήραμε αρχικά για αυτή την διαδικασία
38. Μετράμε την ποσότητα του DNA σε nanodrop και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε 1,5% πήκτωμα αγαρόζης

Στο σημείο αυτό βρισκόμαστε στο πρώτο κρίσιμο στάδιο της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης, καθώς για να μπορούμε να συνεχίσουμε πρέπει να έχουμε την επιθυμητή ποσότητα υλικού που το υπολογίζουμε με το nanodrop αλλά και το μέγεθος της χρωματίνης να είναι κατά βάση μετά την κατάτμηση στις 200-300bp.

Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι η πρότυπη μέθοδος για το διαχωρισμό μορίων DNA διαφορετικού μήκους. Βασίζεται στην κίνηση φορτισμένων μορίων σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, στο οποίο τα αρνητικά φορτισμένα μόρια μεταναστεύουν προς το θετικό ηλεκτρόδιο ενώ τα θετικά μόρια μεταναστεύουν προς το αρνητικό ηλεκτρόδιο.

Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης, ο οποίος σχηματίζει πήκτωμα με πόρους, των οποίων η διάμετρος κυμαίνεται από 100 nm – 300 nm. Το μέγεθος των πόρων εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα και κατά συνέπεια η παράμετρος αυτή καθορίζει το εύρος των κλασμάτων DNA που μπορεί να διαχωριστούν. Τόσο το πήκτωμα όσο και το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης έχει παρασκευασθεί από TBE ρυθμιστικό διάλυμα (5x TBE 4 L: 216 g Tris, 110 g βορικό οξύ και 14,9 g EDTA). Το TBE είναι το ρυθμιστικό διάλυμα που επιτρέπει τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος διαμέσου του πηκτώματος όταν ασκηθεί διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού στα άκρα του. Η διαδικασία παραγωγής του πηκτώματος αγαρόζης 2% είναι η παρακάτω: Ζυγίζουμε την ποσότητα της αγαρόζης και τη διαλυτοποιούμε στο ρυθμιστικό διάλυμα υπό την επίδραση θέρμανσης. Επίσης, προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο 1 % (Biochemica) 1:20.000 στο

gel και 1:40.000 στο buffer, για να γίνει ορατό το DNA ύστερα από επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Αδειάζουμε το ρευστό διάλυμα της αгарόζης στο εκμαγείο του πηκτώματος στο οποίο έχουμε τοποθετήσει τα χτένια ώστε να δημιουργηθούν οι θέσεις υποδοχής των δειγμάτων. Μόλις δημιουργηθεί το πήκτωμα, γεμίζουμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης με 1X TBE. Πριν φορτώσουμε τις επιθυμητές ποσότητες των δειγμάτων στο gel, προσθέτουμε σε αυτά τη χρωστική Orange J ώστε να είναι διακριτά και λόγω της γλυκερόλης να κατακρημνιστεί το υλικό μας στα πηγαδάκια. Τέλος, τα δείγματα μετακινούνται από τα αρνητικά προς τα θετικά ηλεκτρόδια έχοντας ρυθμίσει τη συσκευή ηλεκτροφόρησης στα 100 V. Αφού ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, φωτογραφίζουμε το πήκτωμά μας με τη χρήση ειδικής λάμπας UV. Αφού περάσουμε με επιτυχία αυτό το στάδιο τότε προχωράμε την διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης.

Πρόσδεση αντισώματος σε μαγνητικά σφαιρίδια

39. Πλένουμε 3 φορές τα μαγνητικά σφαιρίδια (Dynabeads® Protein G, #10004D LifeTechnologies) με Διάλυμα PBS-T(PBS+0,1% Tween20) σε κάθε πλύσιμο. Χρησιμοποιούμε 150μL σφαιριδίων (beads) (50μL για κάθε 10γ αντισώματος).
40. Επαναδιαλύουμε τα σφαιρίδια σε 0,5%w/v BSA/PBS
41. Επωάζουμε για 1 ώρα στους 4 °C υπό ανάδευση.
42. Μετά το πέρας μιας ώρας τα πλένουμε με 0,02% Tween20/PBS
43. Τα διαμοιράζουμε σε τρία νέα σωληνάρια και με τη βοήθεια μιας μαγνητικής βάσης απομακρύνουμε το υπερκείμενο
44. Σε κάθε σωληνάριο προσθέτουμε ξανά νέο διάλυμα 0,02% Tween20/PBS και 10γ αντισώματος [α-p65 (Abcam, ab7970), α-ThPOK (LSBio, LS-C290361), IgG (παρασκευάστηκε στο εργαστήριο μας)]
45. Μετά την προσθήκη του αντισώματος επωάζουμε για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.

Καθαρισμός χρωματίνης με μαγνητικά σφαιρίδια

46. Αρχικά, μεταφέρουμε σε νέα σωληνάρια 100γ χρωματίνης για κάθε αντίδραση (ανοσοκατακρήμνιση με ειδικό αντίσωμα α-p65, α-ThPOK ή IgG)
47. Ακολούθως, μεταφέρουμε σε νέα σωληνάρια το 1% της ποσότητας της χρωματίνης που θα χρησιμοποιηθεί για ανοσοκατακρήμνιση (10γ-Input 1%)
48. Στα σωληνάρια που περιέχουν το 1%Input από κάθε χρωματίνη, προσθέτουμε διάλυμα κατάτμησης (sonication) μέχρι τα 45μL και τα αποθηκεύουμε στους -80 °C.
49. Στα σωληνάρια που περιέχουν τη χρωματίνη που θα χρησιμοποιηθεί για ανοσοκατακρήμνιση, προσθέτουμε 54,5 μL 20% Triton X-100 (1% τελική συγκέντρωση) και διάλυμα ανοσοκατακρήμνισης (IP) μέχρι το 1ml

50. Ακολουθώ, με την βοήθεια μαγνητικής βάσης, πλένουμε μαγνητικά σφαιρίδια (50μL για κάθε αντίδραση ανοσοκατακρήμνισης) 3 φορές με διάλυμα ανοσοκατακρήμνισης.
51. Διαμοιράζουμε σε αριθμό σωληναρίων ίσο με τον αριθμό των αντιδράσεων ανοσοκατακρήμνισης
52. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο των σωληναρίων των μαγνητικών σφαιριδίων με τη βοήθεια μαγνητικής βάσης.
53. Προσθέτουμε την χρωματίνη (βήμα 49) στα αντίστοιχα σωληνάρια των μαγνητικών σφαιριδίων (βήμα 52).
54. Επωάζουμε για 1 ώρα στους 4 °C υπό ανάδευση

Ανοσοκατακρήμνιση

55. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο των σωληναρίων του βήματος 45 με τη βοήθεια της μαγνητικής βάσης. Τα μαγνητικά σφαιρίδια που παραμένουν στα σωληνάρια έχουν πλέον δεσμεύσει στην επιφάνειά τους το αντίσωμα με το οποίο είχαν επωαστεί.
56. Εκ νέου με τη βοήθεια της μαγνητικής βάσης, μεταφέρουμε την καθαρισμένη χρωματίνη από το βήμα 54 στο αντίστοιχο σωληνάριο με το κατάλληλο αντίσωμα του βήματος 55.
57. Ακολουθεί επώαση για 16 ώρες στους 4 °C υπό ανάδευση.

Πλύσεις

58. Πλένουμε 5 φορές με διάλυμα RIPA κάθε σωληνάριο με τη βοήθεια της μαγνητικής βάσης. Επειδή το διάλυμα είναι πολύ ισχυρό και μπορεί να επηρεάσει την αλληλεπίδραση αντισώματος-αντιγόνου, πρέπει το διάλυμα να απομακρύνεται μετά το πέρας 4 λεπτών
59. Πλένουμε μια φορά με διάλυμα TE-Na
60. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο, με την βοήθεια της μαγνητικής βάσης, και επαναδιαλύουμε τα σφαιρίδια με το διάλυμα έκλουσης (elution buffer)
61. Επωάζουμε τα δείγματα για 30 λεπτά στους 65 °C, με ανάδευση σε vortex κάθε 5 λεπτά. Σε αυτό το σημείο σπάνε οι διασυνδέσεις μεταξύ σφαιριδίων-αντισώματος-πρωτεΐνης που αλληλεπιδρά με DNA
62. Τοποθετούμε τα δείγματα στην μαγνητική βάση και μεταφέρουμε το περιεχόμενο σε νέα tubes
63. Ξεπαγώνουμε από τους -80°C τα Input 1% από το βήμα 48 και προσθέτουμε σε αυτά 2μL SDS 20%
64. Προσθέτουμε σε όλα τα δείγματα 1μL RNaseA
65. και επωάζουμε στους 37°C για 30 λεπτά
66. Προσθέτουμε σε όλα τα δείγματα 4μL ProteinaseK 10mg/ml, αναδεύουμε και τα τοποθετούμε για 30 λεπτά στους 50°C
67. Έπειτα, επωάζουμε τα δείγματα στους 65°C για 16 ώρες

68. Μετά το πέρας των 16 ωρών, ακολουθεί καθαρισμός των δειγμάτων με τη διαδικασία του μείγματος Φαινόλης-Χλωροφορμίου ομοίως με τα βήματα από 27 έως 30
69. Εν συνεχεία, κατακρημνίζουμε το DNA με αιθανόλη, ομοίως με τα βήματα από 31 έως 36
70. Επαναδιαλύουμε την κυτταρική πελέτα με 45μL απιονισμένο H₂O

Διάλυμα λύσης	Διάλυμα πλύσης	Διάλυμα κατάτμησης
50 mM HEPES pH 7,5	10 mM Tris-Cl, pH 8,1	10 mM Tris-Cl, pH 8,1
140 mM NaCl	200 mM NaCl	100 mM NaCl
1 mM EDTA, pH 8	1 mM EDTA, pH 8	1 mM EDTA, pH 8
10 % glycerol	0,5 mM EGTA, pH 8	0,5 mM EGTA, pH 8
0,5 % NP-40	1 mM PMSF	0,1% DOC
0,25% Triton X-100	1X PIC	0,5% N-Lauroysarcosine
1 mM PMSF	ddH ₂ O	1 mM PMSF
1X PIC		1X PIC
ddH ₂ O		ddH ₂ O

Διάλυμα Ανοσοκατακρήμνισης	Διάλυμα RIPA	Διάλυμα TE-Na
10 mM Tris-Cl, pH 8,1	50 mM HEPES pH 7,5	10 mM Tris-HCl, pH 8,1
100 mM NaCl	500 mM LiCl	1 mM EDTA
1 mM EDTA, pH 8	1 mM EDTA, pH 8	100 mM NaCl
0,5 mM EGTA, pH 8	1 % NP-40	ddH ₂ O
1 mM PMSF	0,7% DOC	Διάλυμα έκλουσης
1X PIC	1 mM PMSF	50 mM Tris-HCl, pH 8,1
H ₂ O	1X PIC	10 mM EDTA, pH 8
	ddH ₂ O	1% SDS
		ddH ₂ O

*PIC: protease inhibitors cocktail, DOC: sodium deoxycholate

Πίνακας 9: Συγκεντρωτικός πίνακας με τη σύσταση των διαλυμάτων που χρησιμοποιήσαμε στο πείραμα της ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης

Χρησιμοποιούμε 4μL DNA σε κάθε αντίδραση για έλεγχο της διαδικασίας μέσω PCR πραγματικού χρόνου. Για κάθε γονίδιο του οποίου την έκφραση θέλουμε να εξετάσουμε παρασκευάζουμε ένα μίγμα το οποίο περιέχει τα εξής τα συστατικά που περιγράφονται στον πίνακα 10^A. Επίσης χρησιμοποιούνται οι κατάλληλοι εκκινητές και αντίστοιχα κατάλληλες θερμοκρασίες στο πρόγραμμα της PCR, ώστε να γίνει η πρόσδεση των εκκινητών και κατά συνέπεια η επέκταση από την πολυμεράση, σύμφωνα με τον πίνακα 10B.

(A)

4 μ L template
10 mL 2X SYBR Green KAPA mix (Kapa Biosystems)
1 μ L Primer mix (forward + reverse) 5pmol/ μ L
5 μ L ddH ₂ O

(B)

<i>IFNb</i> 66°C	Fw: ACTGCAACCTTTTCGAAGCCTT Rv: AACACGAACAGTGTGCGCCTAC
<i>NRC21</i> 66°C	Fw: AGAGCACAGACTCCGTGTGAG Rv: GCTGTCCCCTAAAGAGCCCTG
<i>IL8</i> 60°C	Fw: GCAGCTCTGTGTGAAGGTGCAGT Rv: TGTGTTGGCGCAGTGTGGTCC
<i>GAPDH</i> 62,4°C	Fw: TCCCAAAGTCCTCCTGTTTCA Rv: CAGCAGGACACTAGGGAGTCAA

Πίνακας 10: A. Συγκεντρωτικός πίνακας των συστατικών του μίγματος της Real time PCR. B. Συγκεντρωτικός πίνακας με τις αλληλουχίες και τις θερμοκρασίες των εκκινήτων (forward και reverse) για τα γονίδια που εξετάσαμε μετά από ανοσοκατακρήμνιση

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΟΣ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ
1. 95°C	5 λεπτα	Προθέρμανση
2. 95°C	15 δευτερόλεπτα	Αποδιάταξη
3. 60-70 °C (Tm)	20 δευτερόλεπτα	Πρόσδεση εκκινήτων
4. Tm- 95 °C	5 δευτερόλεπτα	Αποδιάταξη, δημιουργία καμπυλών τήξεως

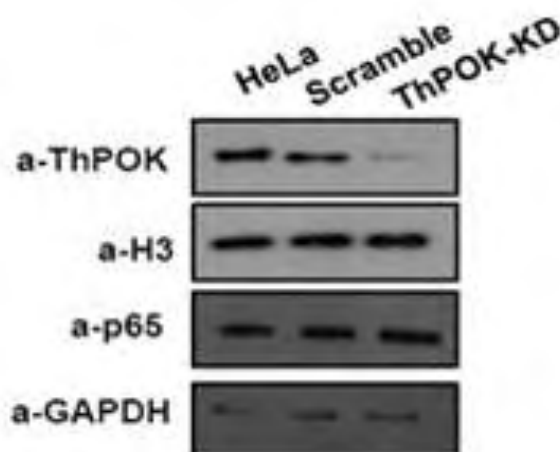
Πίνακας 11: Συγκεντρωτικός πίνακας προγράμματος Real-Time PCR. Η θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινήτων εξαρτάται από τους ίδιους εκκινήτες και διαφέρει κάθε φορά

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Καταστολή έκφρασης γονιδίου ZBTB7B

Ανοσοαποτύπωμα κατά Western

Για την επιβεβαίωση της επιτυχούς αποσιώπησης του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για την έκφραση του ThPOK, με την χρήση λεντι-ιών, απομονώνουμε, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράψαμε παραπάνω, πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κυτταρικές σειρές HeLa: WT, shThPOK και Scramble. Οι κυτταρικές σειρές Scramble έχουν δεχθεί το ίδιο πλασμίδιο με το shRNA του ThPOK αλλά η shRNA αλληλουχία στα Scramble είναι μία τυχαία αλληλουχία που δε στοχεύει σε κάποιο γονίδιο. Χρησιμοποιείται λοιπόν για τον έλεγχο της διαδικασίας και οι όποιες διαφορές του με το shThPOK οφείλονται στην καταστολή του ThPOK και όχι στην όλη διαδικασία της διαμόλυνσης με τον ιό.

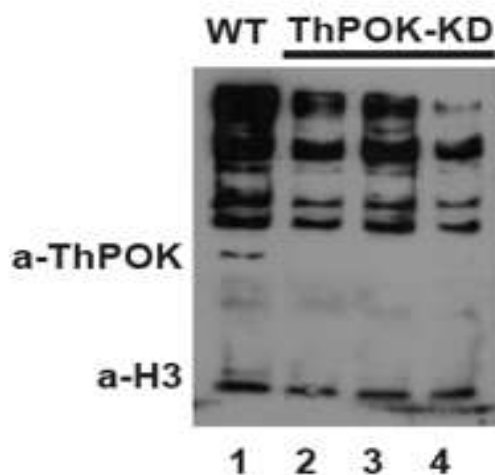


Εικόνα 10: Στύπωμα κατά Western που απεικονίζει τα επίπεδα των ενδογενών ThPOK και p65 πρωτεϊνών σε κύτταρα HeLa που εκφράζουν short hairpin ThPOK RNA (ThPOK-KD), σε RNA scramble ή σε WT HeLa κύτταρα (HeLa)

Σύμφωνα με το αποτέλεσμα της Εικόνας 10 συμπεραίνουμε ότι έχει πραγματοποιηθεί με επιτυχία η γονιδιακή αποσιώπηση του ThPOK σε αυτές τις κυτταρικές σειρές, καθώς βλέπουμε στο φιλμ ότι η ένταση της μπάντας του ThPOK στα ThPOK-KD κύτταρα είναι 80% πιο ασθενής σε σχέση με τα φυσιολογικά HeLa κύτταρα. Με το αντίσωμα έναντι της πυρηνικής ιστόνης H3 αλλά και της GAPDH, επιβεβαιώνουμε ότι το αποτέλεσμα είναι απόρροια γονιδιακής σίγησης και όχι επειδή κατά την διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης κατά western φορτώσαμε σε κάποια θέση του πηκτώματος μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεϊνών. Με την παρουσία των κυτταρικών σειρών Scramble δείχνουμε ότι γονιδιακή μας σίγηση

στα ThPOK-KD είναι ειδική, ενώ με το αντίσωμα για την υπομονάδα p65 δείχνουμε ότι παρόλο που υπάρχει συνεργασία των πρωτεϊνών και ThPOK NF-κB μετά από ιική μόλυνση, η έκφραση του δεύτερου δεν επηρεάζεται από την καταστολή του πρώτου με shRNA.

Εφόσον δείξαμε ότι έχει πραγματοποιηθεί με επιτυχία η γονιδιακή σίγηση του ZBTB7B, μέσω της τεχνικής WB, στις κυτταρικές σειρές HeLa αποδείξαμε το ίδιο και στα κύτταρα HCT116 (Εικόνα 11).



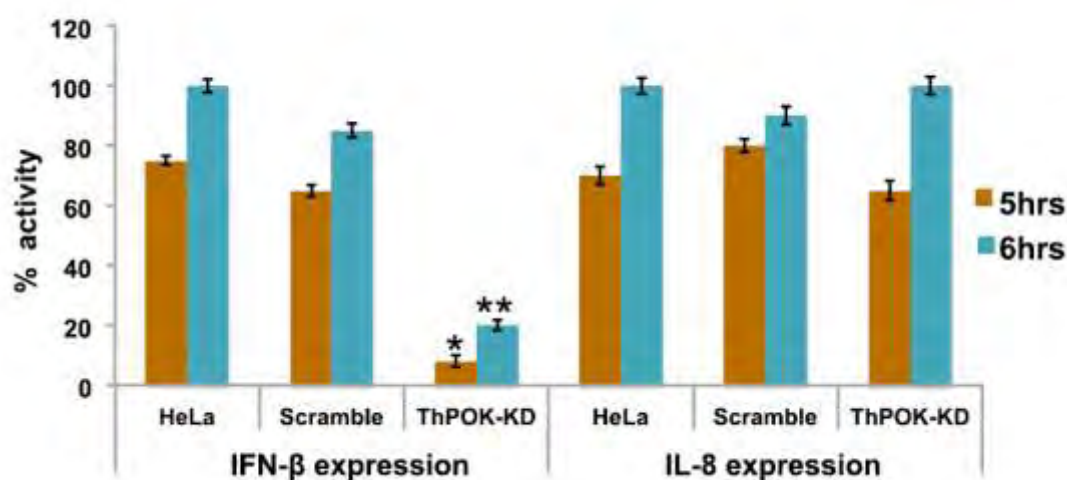
Εικόνα 11: Στύπωμα κατά western που αποτυπώνει τα επίπεδα της ενδογενούς πρωτεΐνης ThPOK σε HCT κύτταρα που εκφράζουν short hairpin ThPOK RNA (ThPOK-KD) (γραμμές 2-4) ή φυσιολογικά HCT κύτταρα (γραμμή 1)

Παρατηρώντας την Εικόνα 11, αντιλαμβανόμαστε ότι έχουμε δημιουργήσει 3 διαφορετικές κυτταρικές σειρές που έχουν μηδαμινή έκφραση της πρωτεΐνης ThPOK μέσω shRNA. Παρατηρούμε ότι και στις 3 κυτταρικές σειρές υπάρχει πλήρης γονιδιακή σίγηση του γονιδίου ThPOK σε σχέση με τα φυσιολογικά HCT116 κύτταρα. Η επώαση της νιτροκυτταρίνης με το αντίσωμα της πυρηνικής ιστόνης H3 επιβεβαιώνει, όπως φαίνεται στην Εικόνα, ότι το αποτέλεσμα είναι προϊόν της αποσιώπησης του γονιδίου ZBTB7B και όχι άνισου φορτώματος κατά την πραγματοποίησης της τεχνικής western blot.

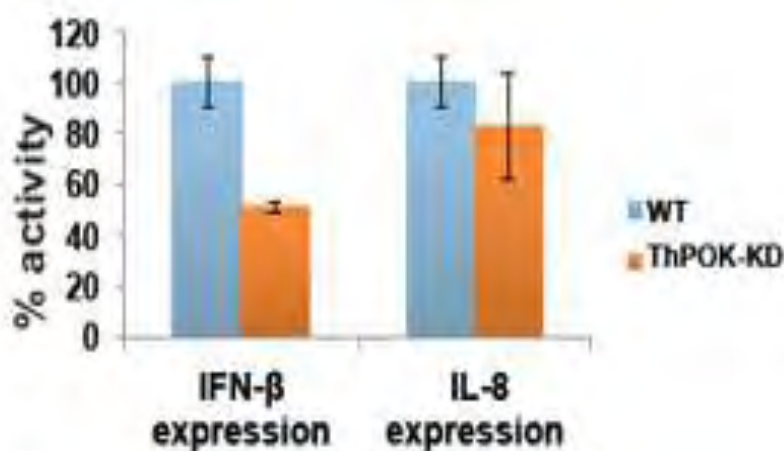
Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου της IFN-β

Η απόδειξη της μειωμένης έκφρασης του ThPOK σε μεταφραστικό επίπεδο αποτελεί ισχυρή ένδειξη πως έχει πραγματοποιηθεί η γονιδιακή σίγηση που επιθυμούμε. Ωστόσο, ελέγξαμε τη σίγηση αυτή και έμμεσα, σε μεταγραφικό επίπεδο, με την έκφραση του γονιδίου της IFN-β και του IL-8. Έχει δειχθεί πως η πρωτεΐνη ThPOK συμμετέχει στις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις με τον ενισχυτή της IFN-β μετά από ιική μόλυνση και επάγει την έκφραση του, ενώ στην περίπτωση της IL-8, της οποίας επίσης επάγεται η έκφραση μετά από ιική μόλυνση, δε φαίνεται να υπάρχουν διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις και τα επίπεδα

έκφρασης του ThPOK δεν παίζουν κάποιο ρόλο στην έκφραση της. Για αυτό το λόγο απομονώσαμε το ολικό RNA από υγιή και μολυσμένα με ιό Sendai φυσιολογικά και shThPOK HeLa και HCT116 κύτταρα. Για τα κύτταρα HeLa έγινε ιική μόλυνση και επώαση για 5 και 6 ώρες, ενώ για τα HCT116 εφαρμόσαμε την ίδια τακτική αλλά με ένα μόνο χρονικό διάστημα (6 ώρες). Αφού έγινε απομόνωση του RNA από τις κυτταρικές σειρές που αναφέραμε, το μετατρέψαμε σε cDNA με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής. Ακολουθώντας, χρησιμοποιώντας εκκινητές για τα γονίδια της IFN- β , IL-8 και GAPDH (γονίδιο αναφοράς), ενισχύσαμε τα cDNA των γονιδίων της IFN- β και IL-8 και παρατηρήσαμε τα επίπεδα έκφρασης τους, μέσω PCR πραγματικού χρόνου.



Εικόνα 12: Διαγραμματική αναπαράσταση της ιικά επαγόμενης έκφρασης (5 και 6 ώρες) των γονιδίων IFN- β και IL-8 σε κύτταρα ελέγχου(HeLa), ThPOK-KD HeLa και Scramble HeLa. Έχει γίνει κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της εικόνας σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου αναφοράς GAPDH. * $p<0,05$ και ** $p<0.01$.



Εικόνα 13: Διαγραμματική απεικόνιση της ιικά επαγόμενης γονιδιακής έκφρασης της IFN- β και της IL-8 σε φυσιολογικά και ThPOK-KD HCT-116 κύτταρα. Έχει γίνει κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων της εικόνας σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου αναφοράς GAPDH.

Με τα παραπάνω αποτελέσματα πέρα από την επιβεβαίωση της επιτυχούς γονιδιακής σίγησης στις κυτταρικές σειρές shThPOK HeLa και HCT116, αποδεικνύουμε ότι ο ThPOK παίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης της IFN-β.

Συν-ανοσοκατακρήμνιση (Co-IP)

Στο εργαστήριό μας έχουμε δείξει, με πειράματα EMSA, την *in vitro* συνεργατική πρόσδεση των πρωτεϊνών NF-κΒ και ThPOK στην περιοχή του ενισχυτή της IFN-β και των NRCs. Με το πείραμα της συν-ανοσοκατακρήμνισης (Co-IP) θέλαμε να μελετήσουμε την *in vivo* συνεργατική αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών μετά από ιική μόλυνση. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήσαμε κυτταρικές σειρές υγιών και μολυσμένων με ιό HeLa και HCT116 κυττάρων, ενώ η ανοσοκατακρήμνιση έγινε με αντίσωμα ειδικό για τον μεταγραφικό παράγοντα ThPOK και με IgG ως αρνητικό μάρτυρα.



Εικόνα 14: Co-IP πείραμα σε μη μολυσμένα και μολυσμένα για 4h με ιό Sendai κύτταρα (HeLa) που δείχνει την αλληλεπίδραση ThPOK και NF-κΒ *in vivo*

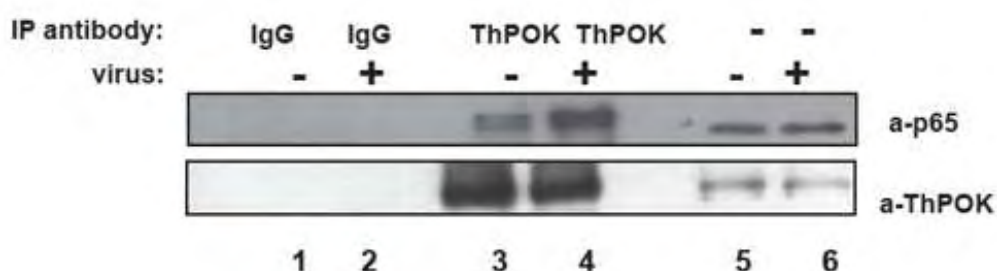
Στην Εικόνα 14 βλέπουμε το αποτέλεσμα του στυπώματος western στα δείγματα της συν-ανοσοκατακρήμνισης σε HeLa κύτταρα. Πραγματοποιήσαμε παράλληλα δύο επαναλήψεις του στυπώματος western. Στην πρώτη, η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης επώαστηκε με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης p65 και στη δεύτερη με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης ThPOK.

Στις θέσεις 1 και 2 βλέπουμε τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα των υγιών και μολυσμένων με ιό HeLa κυττάρων χωρίς να έχει πραγματοποιηθεί ανοσοκατακρήμνιση(input). Η ίδια ένταση του σήματος στις θέσεις 1 και 2 μας διαβεβαιώνει ότι για το πείραμα της συν-ανοσοκατακρήμνισης χρησιμοποιήθηκε η ίδια ποσότητα πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων και στις δύο αυτές συνθήκες (υγιή και μολυσμένα με ιό Sendai κύτταρα).

Στις θέσεις 3 και 4, παρατηρούμε πως, μετά από ιική μόλυνση, αυξάνονται σημαντικά τα επίπεδα αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών που μελετάμε. Η ίδια ένταση του σήματος στη μεμβράνη που έχει επωαστεί με αντίσωμα έναντι του ThPOK, αποδεικνύει πως η διαφορά του σήματος στις θέσεις 3-4, στη μεμβράνη που έχει επωαστεί με αντίσωμα έναντι του p65, είναι λόγω της συνεργατικότητας των δύο αυτών πρωτεϊνών και όχι λόγω άνισης φόρτωσης πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Στις θέσεις 5-6 δεν ανιχνεύουμε σήμα γεγονός που αποδεικνύει πως τα σήματα που ανιχνεύουμε στις υπόλοιπες θέσεις οφείλονται στην ειδική δέσμευση των πρωτογενή αντισώματα a-ThPOK και a-p65 στην ThPOK και p-65 πρωτεΐνη αντίστοιχα.

Ακολουθώντας, προχωρήσαμε στην πραγματοποίηση συν-ανοσοκατακρήμνισης σε υγιή και μολυσμένα με ιό Sendai HCT116 κύτταρα (εικόνα 15) και καταλήξαμε στα ίδια συμπεράσματα.

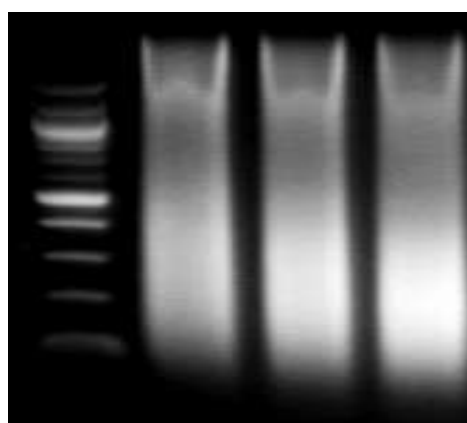


Εικόνα 15: Co-IP πείραμα σε μη μολυσμένα και μολυσμένα για 4h με ιό Sendai κύτταρα (HCT116) που δείχνει την αλληλεπίδραση ThPOK και NF-κB *in vivo*

Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP)

Πραγματοποιώντας πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης, που μελετούν την πρόσδεση των πρωτεϊνών στο DNA, θέλαμε να μελετήσουμε το ρόλο που διαδραματίζουν οι μεταγραφικοί παράγοντες ThPOK και NF-κB στη δημιουργία διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων μετά από ιική μόλυνση και πως αυτές οι αλληλεπιδράσεις επηρεάζονται από τη μειωμένη έκφραση του ThPOK.

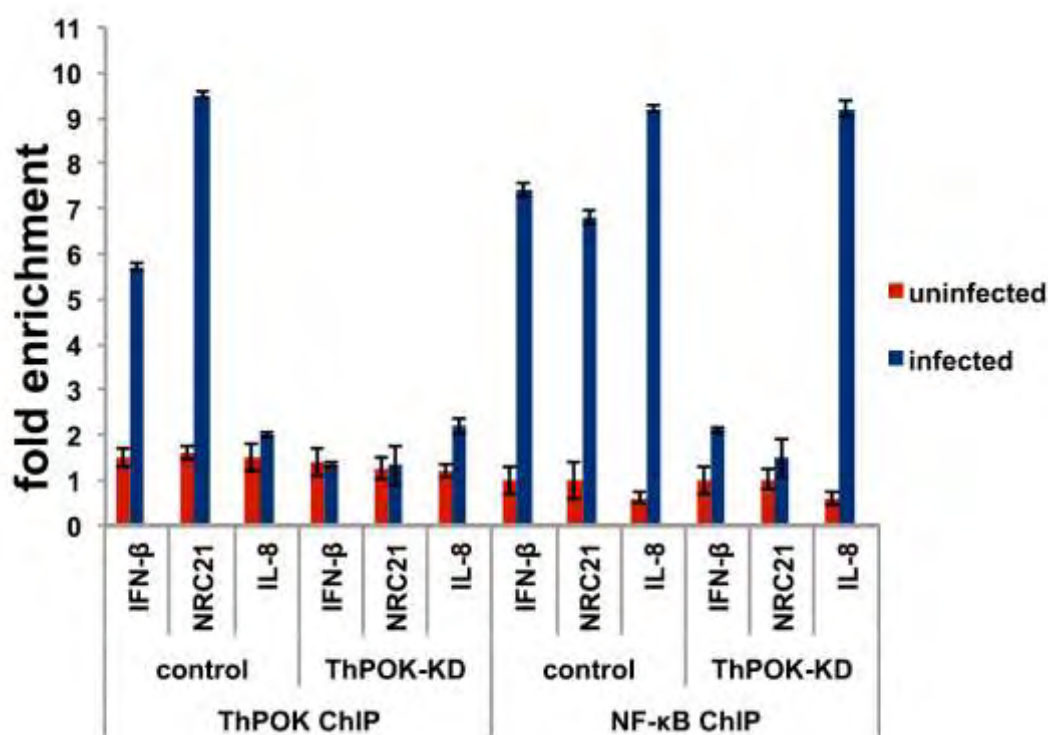
Η διαδικασία του ChIP αποτελείται από πολλά βήματα μέχρι το στάδιο της PCR πραγματικού χρόνου. Το πρώτο κρίσιμο στάδιο του πειράματος είναι η κατάτμηση της χρωματίνης, η οποία πρέπει να αποτελείται από κομμάτια που κυμαίνονται από 200-300bp.



Εικόνα 16: Πήκτωμα αгарόζης 1,5% . Χρωματίνη που έχει κατατμηθεί για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (FastGene® 100bps DNA ladder, MWD100)

Στην Εικόνα 16 βλέπουμε το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων χρωματίνης σε ένα πήκτωμα αγαρόζης. Στο πήκτωμα αυτό έχει φορτωθεί, από τα αριστερά προς τα δεξιά, χρωματίνη από κύτταρα HeLa, η οποία έχει καταταμηθεί στο μηχάνημα covaris για 10, 14 και 18 λεπτά. Βάσει του αποτελέσματος, αποφασίσαμε να πραγματοποιήσουμε το πείραμα με κατάτμηση χρονικής διάρκειας 14 λεπτών, ώστε η πλειοψηφία των κομματιών να είναι στις 200-300 βάσεις. Αντίστοιχα, το ίδιο πραγματοποιήθηκε και για κύτταρα HCT116 και καταλήξαμε πως ο καλύτερος χρόνος κατάτμησης στο μηχάνημα covaris, με τις συνθήκες που περιγράψαμε στα υλικά και μέθοδοι, είναι τα 10 λεπτά.

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης, ακολουθεί PCR πραγματικού χρόνου για τον έλεγχο της πρόσδεσης του ThPOK αλλά και του NF-κB μεταγραφικού παράγοντα στην γενωμική περιοχή του NRC21, του ενισχυτή του γονιδίου της IFN-β και του γονιδίου της IL-8.



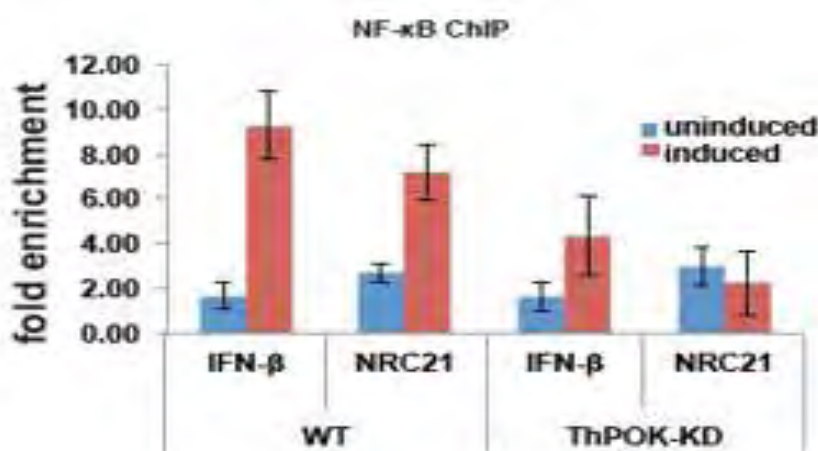
Εικόνα 17: Πείραμα ChIP. Διάγραμμα που δείχνει την αύξηση δέσμευσης στο DNA των ThPOK (αριστερά) και NF-κB (δεξιά) σε IFN-β, NRC21 και IL-8 σε HeLa κύτταρα ελέγχου και ThPOK-KD κύτταρα που επάγονται με ιό για 2 ώρες (ThPOK ChIP) ή 4 ώρες (NF-κB ChIP)

Πραγματοποιήθηκε ThPOK ChIP σε υγιή και μολυσμένα με ιό Sendai, φυσιολογικά και σε shThPOK HeLa κύτταρα. Πραγματοποιήσαμε ιική μόλυνση για το χρονικό διάστημα των 2 ωρών, καθώς σύμφωνα με προηγούμενα ChIP πειράματά μας, ο ThPOK προσδένεται πρώτα στις περιοχές των NRCs και είναι αυτό που μεταφέρει τον NF-κB μέσω διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων στον ενισχυτή της IFN-β. Στην Εικόνα 17, παρατηρούμε πως στα φυσιολογικά HeLa κύτταρα, μετά από ιική μόλυνση, έχουμε αύξηση της πρόσδεσης του ThPOK στο NRC21 αλλά και στον ενισχυτή της IFN-β, σε σχέση με τα υγιή κύτταρα. Αντιθέτως

δεν παρατηρούμε καμία αύξηση της πρόσδεσης όσον αφορά τον υποκινητή του γονιδίου της IL-8.

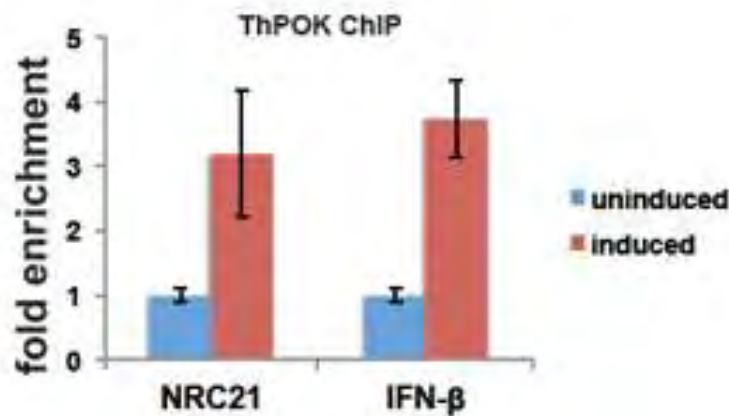
Στο NF-κB ChIP (α-p65) χρησιμοποιήσαμε φυσιολογικά HeLa κύτταρα και HeLa κύτταρα που είχε γίνει επιτυχής γονιδιακή σίγηση στο γονίδιο που εκφράζει την πρωτεΐνη του ThPOK (shThPOK), όπως δείξαμε στα παραπάνω πειράματα. Η ιική μόλυνση πραγματοποιήθηκε για το χρονικό διάστημα των 4 ωρών και παρατηρήσαμε πως σε εκείνο το χρονικό σημείο σημειώθηκε σημαντική αύξηση της πρόσδεσης του NF-κB στην περιοχή του NRC21 αλλά και στον ενισχυτή της IFN-β. Επίσης, στα κύτταρα που έχουν υποστεί γονιδιακή σίγαση για τον ThPOK, η μείωση της πρόσδεσης του NF-κB στην περιοχή του NRC21, αλλά και στον ενισχυτή της IFN-β, δείχνει ότι η παρουσία του ThPOK είναι απαραίτητη για τις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των NRCs και του ενισχυτή της IFN-β μετά από ιική μόλυνση.

Ένα επιπλέον σημαντικό δεδομένο είναι η αύξηση της πρόσδεσης του NF-κB στην περιοχή του υποκινητή της IL-8 κάτι το οποίο δεν παρατηρείται με τον ThPOK. Το δεδομένο αυτό είναι σε συμφωνία με τα πειράματα έκφρασης (Εικόνα 17), στα οποία η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της IL-8, μετά από ιική μόλυνση, είναι ανεξάρτητη της μείωσης των πρωτεϊνικών επιπέδων του ThPOK. Επομένως, η IL-8 αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα γονιδίου του οποίου η έκφραση αλλά και η πρόσδεση του NF-κB στον υποκινητή του, αυξάνονται μετά από ιική μόλυνση και είναι ανεξάρτητες από τα επίπεδα έκφρασης του ThPOK.



Εικόνα 18: Πείραμα ChIP. Διάγραμμα απεικόνισης των αποτελεσμάτων ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης για τον υπολογισμό της μεταβολής των επιπέδων πρόσδεσης του NF-κB στην IFN-β και τον NRC21 σε φυσιολογικά και ThPOK-KD, υγιή ή μολυσμένα με Sendai ιό για 4 ώρες HCT-116 κύτταρα.

Ακολουθώντας, επαναλάβουμε τη διαδικασία της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης με αντίσωμα έναντι του ThPOK σε υγιή και μολυσμένα με ιό Sendai HCT116 κύτταρα. Στην Εικόνα 18, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της PCR πραγματικού χρόνου παρατηρούμε πως μετά από ιική μόλυνση, αυξάνεται η πρόσδεση του ThPOK στον ενισχυτή του γονιδίου της IFN-β και στην περιοχή του NRC21.



Εικόνα 19: Οι ThPOK και NF-κB προσδένονται στο ενδογενές NRC και την IFN-β σε μολυσμένα με ιό HCT-116 κύτταρα. Το διάγραμμα απεικονίζει τα επίπεδα πρόσδεσης του ThPOK στο NRC21 και στον ενισχυτή του γονιδίου της IFN-β.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήσαμε ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης με αντίσωμα έναντι της υπομονάδας p-65 του NF-κB, σε υγιή και μολυσμένα με ιό Sendai φυσιολογικά και ThPOK-KD HCT116 κύτταρα. Παρατηρούμε πως στα φυσιολογικά κύτταρα, μετά από ιική μόλυνση, έχουμε αύξηση της πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB στον ενισχυτή της IFN-β καθώς και στον NRC21 που συμμετέχει στις διαχρωμοσωμικές αλληλεπιδράσεις. Αντιθέτως, η μείωση των επιπέδων του ThPOK έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της πρόσδεσης του NF-κB στην IFN-β και στον NRC21 μετά από ιική μόλυνση.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης στα HCT116 κύτταρα, σε συνδυασμό με τα αντίστοιχα των HeLa κυττάρων, καθώς και με τα πειράματα γονιδιακή έκφρασης, επιβεβαιώνουν τη συνεργασία των μεταξύ του ThPOK και του NF-κB κατά την πρόσδεσή τους στο DNA και τη δημιουργία διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των NRCs και του ενισχυτή της IFN-β που οδηγούν στην επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της IFN-β μετά από ιική μόλυνση.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η συνεργατική πρόσδεση φαίνεται να είναι εξαιρετικά σημαντική σε πολλές πτυχές της λειτουργικότητας των μεταγραφικών παραγόντων. Οι ενισχυτές, οι οποίοι είναι χαρακτηριστικό ρυθμιστικό στοιχείο των ευκαρυωτικών οργανισμών, περιέχουν θέσεις πρόσδεσης για πολλούς παράγοντες και περιέχουν την πληροφορία που απαιτείται για να κατοχυρωθεί ότι κάθε γονίδιο θα είναι ενεργό στα σωστά κύτταρα τη σωστή στιγμή. Η αποκωδικοποίηση της πληροφορίας στους ενισχυτές εξαρτάται από τη συνεργατική κατασκευή ενός συμπλέγματος που θα προσδένεται στον ενισχυτή και η αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων είναι σημαντική τόσο για τη ρύθμιση της λειτουργίας τους όσο και για τον καθορισμό της ειδικότητας στην πρόσδεση του DNA.

Το ενισχυόσωμα της IFN-β, το οποίο μας απασχόλησε σε αυτή την διπλωματική εργασία, αποτελεί ένα από τα πιο εκτενώς μελετημένα και πιο καλά χαρακτηρισμένα παραδείγματα συνεργατικής πρόσδεσης. Η συνεργατικότητα της πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων στο DNA είναι ο βιοχημικός μηχανισμός που καθορίζει την ειδικότητα και την ευαισθησία ποικίλων DNA μοριακών λειτουργιών. Η συνεργατική δέσμευση δύο ή περισσότερων πρωτεϊνών στο DNA, οδηγεί στη σταθεροποίησή τους σε αυτό. Η υψηλή αλληλεπίδραση και εξειδίκευση της συνεργατικής δέσμευσης καθορίζεται από τη στερεοειδική συσσώρευση των θέσεων πρόσδεσής τους. Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο μας έδειξαν πώς η συνεργατική πρόσδεση στο DNA στερεοειδικώς ευθυγραμμισμένων μεταγραφικών παραγόντων προσδίδει την απαραίτητη υπερευαισθησία για τις στοχαστικές αποκρίσεις κυττάρων κατά την ιική μόλυνση.

Επιπρόσθετα, η πρόσδεση του NF-κΒ στον ενισχυτή της IFN-β με σκοπό την δημιουργία του ενισχυοσώματος, ενισχύεται από τη δημιουργία αλληλεπιδράσεων μεταξύ απομακρυσμένων γενωμικών περιοχών (NRCs) και του ενισχυτή της IFN-β. Σύμφωνα με πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο μας, αλλά και περιγράψαμε σε αυτή την διπλωματική εργασία, προτείνουμε ένα μοντέλο με το οποίο η επαγόμενη από ιό εισαγωγή του NF-κΒ στον πυρήνα και η ταυτόχρονη αλληλεπίδραση του με τον ThPOK, οδηγεί στη συνεργατική τους πρόσδεση στα NRCs. Ακολούθως, ο μεταγραφικός παράγοντας ThPOK διαμεσολαβεί τη φυσική εγγύτητα των NRCs με το γονίδιο της IFN-β μέσω της ικανότητάς του να ολιγομερίζεται όταν δεσμεύεται στο DNA. Το μοντέλο αυτό υποστηρίζεται τόσο από τα πειράματα μεταλλάξεων στις θέσεις πρόσδεσης ThPOK και NF-κΒ, που πραγματοποιήθηκαν πριν την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας από μέλη του εργαστηρίου, όσο και από την αποσιώπηση της έκφρασης του ThPOK, όπου και στις δύο περιπτώσεις έχουμε δραματική μείωση των διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων αλλά και των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου της IFN-β.

Τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα αποτέλεσαν το έναυσμα για έναν νέο κύκλο πειραμάτων. Αρχικά, πραγματοποιήσαμε ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης τόσο για τον ThPOK όσο και για τον NF-κΒ σε φυσιολογικά και ThPOK-KD HeLa κύτταρα. Στη συνέχεια, κατασκευάσαμε DNA βιβλιοθήκες από τις επιμέρους ανοσοκατακρημνισμένες χρωματίνες και ακολούθησε αλληλούχισή τους. Η

σύγκριση των αποτελεσμάτων των ChIP του ThPOK και του p65 στα μολυσμένα με ιό και υγιή φυσιολογικά HeLa κύτταρα θα αποκαλύψει τις περιοχές εκείνες οι οποίες, ύστερα από ιική μόλυνση, βρίσκονται υπό την κοινή ρύθμιση των δύο αυτών μεταγραφικών παραγόντων. Ακολούθως, η σύγκριση των αποτελεσμάτων πρόσδεσης του p65 σε φυσιολογικά και ThPOK-KD HeLa κύτταρα, θα αποκαλύψει τις περιοχές στις οποίες προαπαιτείται η παρουσία του ThPOK ώστε να προσδεθεί ο NF-κΒ ύστερα από ιική μόλυνση.

Τέλος, στα προτεινόμενα μελλοντικά πειράματα προστίθεται και η δημιουργία σταθερών κυτταρικών σειρών με γονιδιακή σίγηση για τον NF-κΒ (p65-KD). Η Ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης σε αυτές τις κυτταρικές σειρές, σε συνδυασμό με αλληλούχιση RNA σε φυσιολογικά, ThPOK-KD και p65-KD HeLa κύτταρα, θα ενισχύσει την ευαισθησία και την ακρίβεια του προσδιορισμού του συνόλου των γενωμικών περιοχών που βρίσκονται υπό τον έλεγχο της συνεργατικής πρόσδεσης των ThPOK και NF-κΒ μεταγραφικών παραγόντων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

-
- ¹ Το κύτταρο, μια μοριακή προσέγγιση, Cooper M. Geoffrey, Hausman E. Robert
- ² Genes VIII, Benjamin Lewin, Έτος Έκδοσης: 2004
- ³ Roger D. Kornberg Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA, Science, 1974
- ⁴ M. Noll. Subunit structure of chromatin., Nature, 1974.
- ⁵ Burlingame RW, Crystals of the octameric histone core of the nucleosome, Science. 1984
- ⁶ Fischle W et al. Current Opinion in Cell Biology 15: 172-183, 2003
- ⁷ Peterson CL and Laniel MA. Current Biology 14: R546-R551, 2004
- ⁸ Χρύσα Νικοπούλου, Μεταγραφική ρύθμιση μέσω διαχρωμοσωμικών αλληλεπιδράσεων και τρισδιάστατης δομής του πυρήνα, 2016
- ⁹ Thanos and Maniatis. Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome. Cell, 1995
- ¹⁰ Sen and Baltimore. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. Cell, 1986.
- ¹¹ Sullivan and Kalaitzidis. Rel homology domain-containing transcription factors in the in the cnidarian Nematostella vectensis. Dev. Genes Evol., 2007.
- ¹² Sacconi S. Degradation of promoter-bound p65/RelA is essential for the prompt termination of the nuclear factor kappaB response. J. Exp. Med. 200, 107–113, 2004.
- ¹³ Jacobs MD, Harrison SC. "Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex" . s.l. : Cell, pages: 749–58, 1998.
- ¹⁴ Israel, Alain. The IKK Complex, a Central Regulator of NF-kB Activation. s.l. : Cold Spring Harb Perspect Biol., 2010.
- ¹⁵ ND. Perkins. "Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function". s.l. : Nature Reviews Molecular Cell Biology., 2007, pages: 49–62.
- ¹⁶ Mamane, Y., C. Heylbroeck, et al. "Interferon regulatory factors: the next generation." Gene 237(1): 1-14, 1999.
- ¹⁷ Taniguchi, T., K. Ogasawara, et al. "IRF family of transcription factors as regulators of host defense." Annu Rev Immunol 19: 623-55, 2001.
- ¹⁸ Miyamoto, M., T. Fujita, et al. "Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements." Cell 54(6): 903-13, 1988.
- ¹⁹ Apostolou, E., and Thanos, D. Virus Infection Induces NF-kappaB-dependent

interchromosomal associations mediating monoallelic IFN-beta gene expression. *Cell* 134, 85–96, 2008.

²⁰ Maeda T. Regulation of hematopoietic development by ZBTB transcription factors. *Int J Hematol.* 104(3):310-23, 2016.

²¹ Galera, P., Musso, M., Ducy, P., and Karsenty, G. c-Krox, a transcriptional regulator of type I collagen gene expression, is preferentially expressed in skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 9372–9376, 1994.

²² Widom, R.L., Culic, I., Lee, J.Y., and Korn, J.H. Cloning and characterization of hcKrox, a transcriptional regulator of extracellular matrix gene expression. *Gene* 198, 407–420, 1997.

²³ Park, R.-W. c-Krox Binds to Several Sites in the Promoter of Both Mouse Type I Collagen Genes. STRUCTURE/FUNCTION STUDY AND DEVELOPMENTAL EXPRESSION ANALYSIS. *J. Biol. Chem.* 271, 21331–21339, 1996.

²⁴ Beauchef, G., Bigot, N., Kypriotou, M., Renard, E., Poree, B., Widom, R., Domp Martin-Blanchere, A., Oddos, T., Maquart, F.-X., Demoor, M., et al. The p65 Subunit of NF- κ B Inhibits COL1A1 Gene Transcription in Human Dermal and Scleroderma Fibroblasts through Its Recruitment on Promoter by Protein Interaction with Transcriptional Activators (c-Krox, Sp1, and Sp3). *J. Biol. Chem.* 287, 3462–3478, 2012.

²⁵ He, X., Park, K., Wang, H., He, X., Zhang, Y., Hua, X., Li, Y., and Kappes, D.J. CD4-CD8 Lineage Commitment Is Regulated by a Silencer Element at the ThPOK Transcription-Factor Locus. *Immunity* 28, 346–358, 2008.

²⁶ Ciucci T¹, Vacchio MS¹, Gao Y¹, The Emergence and Functional Fitness of Memory CD4⁺ T Cells Require the Transcription Factor Thpok. *Immunity*, Epub, 2019.

²⁷ Egawa, T., and Littman, D.R. ThPOK acts late in specification of the helper T cell lineage and suppresses Runx-mediated commitment to the cytotoxic T cell lineage. *Nat. Immunol.* 9, 1131–1139, 2008.

²⁸ Luckey, M.A., Kimura, M.Y., Waickman, A.T., Feigenbaum, L., Singer, A., and Park, J.-H. The transcription factor ThPOK suppresses Runx3 and imposes CD4⁺ lineage fate by inducing the SOCS suppressors of cytokine signaling. *Nat. Immunol.* 15, 638–645, 2014.

²⁹ Zullo, J.M., Demarco, I.A., Piquet-Regi, R., Gaffney, D.J., Epstein, C.B., Spooner, C.J., Luperchio, T.R., Bernstein, B.E., Pritchard, J.K., Reddy, K.L., et al. DNA Sequence-Dependent Compartmentalization and Silencing of Chromatin at the Nuclear Lamina. *Cell* 149, 1474–1487, 2012.

³⁰ Stratigi, K., Kapsetaki, M., Aivaliotis, M., Town, T., Flavell, R.A., and Spilianakis, C.G. Spatial proximity of homologous alleles and long noncoding RNAs regulate a switch in allelic gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E1577–E1586, 2015.

³¹ Zhang, M., Zhang, J., Rui, J., and Liu, X. p300-Mediated Acetylation Stabilizes the Th-Inducing POK Factor. *J. Immunol.* 185, 3960–3969, 2010.

-
- ³² Collins, A., Hewitt, S.L., Chaumeil, J., Sellars, M., Micsinai, M., Allinne, J., Parisi, F., Nora, E.P., Bolland, D.J., Corcoran, A.E., et al. RUNX Transcription Factor-Mediated Association of Cd4 and Cd8 Enables Coordinate Gene Regulation. *Immunity* 34, 303–314, 2011.
- ³³ Lopez-Camacho C, van Wijnen AJ, Lian JB, Stein JL, Stein GS. Core binding factor β (CBF β) is retained in the midbody during cytokinesis. 2014.
- ³⁴ Ανοσολογία Kuby, Goldsby A. Richard, Kindt J. Thomas, Osborne A. Barbara
- ³⁵ Maniatis T, Weintraub H. Gene expression and differentiation. s.l. : Curr Opin Genet Dev, pages: 197-198, Τόμ. 2, 1992.
- ³⁶ Thanos D, Maniatis T. The high mobility group protein HMG I(Y) is required for NF κ B-dependent virus induction of the human IFN-beta gene. s.l. : Cell., 1992.
- ³⁷ Berkowitz, B., Huang, D.-B., Chen-Park, F.E., Sigler, P.B., and Ghosh, G. The x-ray crystal structure of the NF-kappa B p50.p65 heterodimer bound to the interferon beta -kappa B site. *J. Biol. Chem.* 277, 24694–24700, 2002.
- ³⁸ Panne, D., Maniatis, T., and Harrison, S.C. An atomic model of the interferon-beta enhanceosome. *Cell* 129, 1111–1123, 2007.
- ³⁹ Munshi, N., T. Agalioti, et al. "Coordination of a transcriptional switch by HMGI(Y) acetylation." *Science* 293(5532): 1133-6, 2001.
- ⁴⁰ Agalioti, T., Lomvardas, S., Parekh, B., Yie, J., Maniatis, T., and Thanos, D. Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell* 103, 667–678, 2000.
- ⁴¹ Falvo, J. V., D. Thanos, et al. "Reversal of intrinsic DNA bends in the IFN beta gene enhancer by transcription factors and the architectural protein HMG I(Y)." *Cell* 83(7): 1101-11, 1995.
- ⁴² Geierstanger, B. H., B. F. Volkman, et al. "Short peptide fragments derived from HMG-I/Y proteins bind specifically to the minor groove of DNA." *Biochemistry* 33(17): 5347-55, 1994.
- ⁴³ Agalioti, T., G. Chen, et al. "Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene." *Cell* 111(3): 381-92, 2002.
- ⁴⁴ Merika, M., A. J. Williams, et al. "Recruitment of CBP/p300 by the IFN beta enhanceosome is required for synergistic activation of transcription." *Mol Cell* 1(2): 277-87, 1998.
- ⁴⁵ Xie, H., Wang, M., Bonaldo, M. de F., Smith, C., Rajaram, V., Goldman, S., Tomita, T., and Soares, M.B. High-throughput sequence-based epigenomic analysis of Alu repeats in human cerebellum. *Nucleic Acids Res.* 37, 4331–4340, 2009.
- ⁴⁶ Senger, K., M. Merika, et al. "Gene repression by coactivator repulsion." *Mol Cell* 6(4): 931-7, 2000.

⁴⁷ Apostolou, E., and Thanos, D. Virus Infection Induces NF-kappaB-dependent interchromosomal associations mediating monoallelic IFN-beta gene expression. *Cell* 134, 85–96, 2008.